

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

**MAGE-A4 ja MAGE-A10 valkude ekspresseerumine  
ekstratsellulaarsetes vesiikulites**

Magistritöö

30 EAP

Magda Karakai

Juhendaja *Ph. D.* Reet Kurg

**TARTU 2017**

# Infoleht

„MAGE-A4 ja MAGE-A10 valkude ekspresseerumine ekstratsellulaarsetes vesiikulites“. Magistritöös uuritakse vähi antigeenide MAGE-A4 ja MAGE-A10 ekspresseerumist ekstratsellulaarsetes vesiikulites. Töö eesmärgiks on selgitada välja, kas rakkudesse sisestatud MAGE-A4 ja MAGE-A10 valgud avalduvad ekstratsellulaarsete vesiikulite koostises. Eksperimentaalses osas transfecteeriti eukarüootseid COP5EBNA, HEK293 ja U2OS rakke plasmiididega pQM-MAGE-A4 ja pQM-MAGE-A10 ning leiti, et MAGE-A4 ja MAGE-A10 ekspressiooniprofiil ekstratsellulaarsetes vesiikulites on üsna erinev. MAGE-A4 valk ekspresseerus kõigis kolmes vesiikulitüübis (eksosoomid, mikrovesiikulid, apoptootilised kehakesed), aga MAGE-A10 valku ei esinenud Immunoblot analüüsis. Mõlemat valku leidis ekstratsellulaarsete vesiikulite pinnal, aga MAGE-A10 ekspressioon oli MAGE-A4 omast tunduvalt madalam. MAGE-A4 valgu puhul uuriti ka tema olemasolu erinevates rakuorganites ja leiti, et tegu on tsütoplasmal valguga, mida teistes uuritavates rakuorganites ei ekspresseerunud.

**Märksõnad:** vähi antigeenid, MAGE-A4, MAGE-A10, ekstratsellulaarsed vesiikulid, eksosoomid, mikrovesiikulid, apoptootilised kehakesed.

„Expression of MAGE-A4 and MAGE-A10 proteins in extracellular vesicles“. The present thesis studies the expression of tumor antigens MAGE-A4 and MAGE-A10 in extracellular vesicles. The aim of thesis is to find out whether MAGE-A4 and MAGE-A10 proteins express in the extracellular vesicles of the cells transfected with respective plasmids. In the experimental part, eukaryotic COP5EBNA, HEK293 and U2OS cells were transfected with plasmids pQM-MAGE-A4 and pQM-MAGE-A10. It was found that the expression profiles of MAGE-A4 and MAGE-A10 in extracellular vesicles are quite different. MAGE-A4 protein were expressed in all three types of vesicles (exosomes, microvesicles, apoptotic bodies), but MAGE-A10 protein was not expressed in Immunoblot analysis. Both proteins were present in the surface of extracellular vesicles, but the expression rate of MAGE-A10 was considerably lower than MAGE-A4. MAGE-A4 presence in different cell organs was also studied and the antibody appeared to be a cytoplasmic protein not present in other cell organs examined in the study.

**Keywords:** tumor antigens, MAGE-A4, MAGE-A10, extracellular vesicles, exosomes, microvesicles, apoptotic bodies.

# Sisukord

Kasutatud lühendid.....	5
Sissejuhatus.....	6
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 Vähi antigeenid.....	7
1.1.1 MAGE perekond.....	8
1.1.2 MAGE-A perekond.....	10
1.1.3 MAGE-A4.....	12
1.1.4 MAGE-A10.....	13
1.2 Ekstratsellulaarsed vesiikulid.....	14
1.2.1 Ekstratsellulaarsete vesiikulite ülesanded ja võimalikud kasutusala meditsiinis	16
1.2.2 Ekstratsellulaarsete vesiikulite eraldamine ja puhastamine.....	19
2 EKSPERIMENTAALNE OSA.....	21
2.1 Töö eesmärgid.....	21
2.2 Materjalid ja meetodika.....	22
2.2.1 Kasutatud plasmiidid.....	22
2.2.2 Rakuliinid.....	22
2.2.3 Antikehad.....	22
2.2.4 Eukarüootsete rakkude transfecteerimine.....	24
2.2.5 Ekstratsellulaarsete vesiikulite puhastamine.....	24
2.2.6 Valguforees ja Western blot analüüs.....	25
2.2.7 Fluorestsents-aktiveeritud raku sorteerimine (FACS).....	26
2.2.8 Immunofluorestsentsanalüüs.....	27
2.3 Tulemused.....	28
2.3.1 Ekstratsellulaarsete vesiikulite genereerimine ja puhastamine.....	28
2.3.2 MAGE-A valkude ekspresseerumine ekstratsellulaarsetes vesiikulites.....	31
2.3.3 MAGE-A valkude ekspresseerumine ekstratsellulaarsete vesiikulite pinnal.....	34
2.3.4 MAGE-A4 ja MAGE-A10 lülitumine ekstratsellulaarsetesse vesiikulitesse HEK293 ja U2OS rakkudes.....	36
2.3.5 MAGE-A4 valgu ekspresseerumine U2OS rakkudes – immunofluorestsentsanalüüs.....	43
2.4 Arutelu.....	48
Kokkuvõte.....	51

Tänuavaldused.....	52
Kasutatud kirjandus.....	53
Kasutatud veebiaadressid.....	58
Summary.....	59
Lihtlitsents.....	61

## **Kasutatud lühendid**

EV – ekstratsellulaarne vesiikul

FCS – vasika loote seerum

MAGE-A – melanoomiseoseline antigeen A

MAGE-A4 – melanoomiseoseline antigeen A4

MAGE-A10 – melanoomiseoseline antigeen A10

pQM-MAGE-A4 – MAGE-A4 plasmiid

pQM-MAGE-A10 – MAGE-A10 plasmiid

## Sissejuhatus

Vähi antigeenid on immunogeensed valgud, mis ekspresseeruvad peaaegu ainult kasvajarakkudes. Esmakordselt tuvastati vähi antigeenid melanoomirakkudes ja praeguseks on leitud umbes 20 antigeeniperekonda, mille tuntuim ühine omadus on piiratud ekspressiooniprofiil. Kuna vähi antigeenid on immunogeensed ja nende ekspressioon somaatilistes kudedes on tugevalt piiratud kasvajatega, on nad potentsiaalsed immunoteraapia sihtmärgid.

Käesolevas töös on vähi antigeenidest uuritud antigeene MAGE-A4 ja MAGE-A10. Mõlemad on rangelt kasvajaspetsiifilised valgud ja neid ekspresseeritakse paljudes erinevates vähkkasvajates, seetõttu asuvad nad vähi immunoteraapia huviorbiidis. Kuna MAGE-A perekonna antigeenidel võib olla inimese vähi arengus suur osa metastaaside tekkel, on oluline teada, kuidas nad organismis levivad. Magistritöö aluseks on hüpotees, et MAGE-A4 ja MAGE-A10 antigeenid kanduvad ühest rakust teise ekstratsellulaarsete vesiikulite abil. Ekstratsellulaarsed vesiikulid on membraaniga ümbritsetud partiklid, mida suur osa rakke vabastab rakuvälisesse keskkonda ning mis osalevad mitmesuguste biomolekulide transpordis rakkude ja kudede vahel.

Siinse uurimistöö eesmärgiks on selgitada välja, kas rakkudesse sisestatud MAGE-A4 ja MAGE-A10 valgud avalduvad ekstratsellulaarsete vesiikulite koostises. Selleks uuritakse vastavate valkude esinemist nii ekstratsellulaarsetes vesiikulites kui ka nende pinnal. MAGE-A4 valgu puhul vaadeldakse ka üksikasjalikult, missugustes raku organites ta täpsemalt ekspresseerub.

Uurimistöö valmis Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudis.

# 1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Vähi antigeenid

Vähi antigeenid, mida nimetatakse ka vähi-testise antigeenideks (ingl. k *cancer-testis antigens*), on immunogeensed valgud, mis ei ekspresseeru tervetes somaatilistes kudedes, vaid ainult kasvajarakkudes. Nende ekspressioon on proportsioonis kasvaja levikuga organismis. Vähi antigeenide loomulik ekspressioon on piiratud testistega ja harvadel juhtudel ekspresseeritakse neid ka munasarjades ning trofoblastis. (Almeida jt, 2009; Scanlan jt, 2002) Vähi antigeenid tuvastati esmakordselt melanoomi rakkudes, T-raku epitoobi kloonimise teel, ja praeguseks on leitud umbes 20 antigeeniperekonda. Nende tuntum ühine omadus on piiratud ekspressiooniprofiil – normaalolekus avalduvad nad peamiselt munandites. Iseloomulike omadustena, mida kõik vähi antigeenid ja antigeenide perekonnad jagavad, võib välja tuua ka eksisteerimise multigeeniperekondadena, sagedase koosinemise X-kromosoomis ja heterogeense valguekspressiooni vähis. Vähi antigeenide avaldumine on tõenäoliselt seotud vähi arenguga. Ekspressiooni kutsuvad esile promootori piirkonna hüpometülatsioon ja/või histoonide atsetülatsioon. Vähi antigeenid on immunogeensed: nad kutsuvad esile spetsiifilise humoraalse või rakulise immuunvastuse. (Scanlan jt, 2002)

Kuna vähi antigeenid on immunogeensed ja nende ekspressioon somaatilistes kudedes on tugevalt piiratud kasvajatega, on nende avastamisele järgnenud katsed arendada välja antigeenispetsiifilisi vähivaktsiine, mille tööpõhimõte seisneb efektiivse immuunvastuse esilekutsumises vähi vastu. Hetkeseisuga on pooleli kliinilised katsed MAGE-A ja NY-ESO-1 perekonna valkudega. Kliinilise testimise käigus uuritakse, kas väljaarendatavad vähivaktsiinid võivad edasi lükata või ära hoida kopsuvähi ja melanoomi taasteket pärast seda, kui kasvaja ise on kirurgiliselt eemaldatud. (Almeida jt, 2009; Scanlan jt, 2002)

Antigeenispetsiifilise vähi immunoteraapia kõige olulisem samm on sobivate sihtmärkide leidmine. Selleks, et antigeen oleks potentsiaalne immunoteraapia sihtmärk, peab tema ekspressioon tavalistes kudedes kas puuduma või olema tugevalt piiratud, et ennetada autoimmuunsuse teket. Vähi antigeenid sobivad immunoteraapiaks, kuna nende ekspressioon normaalses koes on väga piiratud, piirdudes vaid munanditega ja platsentaga. (Sang jt, 2011) Lisaks ekspresseeritakse vähi antigeene ebaküpsetes rakkudes, näiteks spermatogooniumi ja oogooniumi rakkudes ning trofoblastides (Zendman jt, 2003; Simpson jt, 2005; Scanlan jt, 2004).

### ***1.1.1 MAGE perekond***

MAGE (melanoomiseoselised antigeenid) perekonda on esmakordselt kirjeldatud 1991. aastal, kui melanoomipatsientidelt võetud proovidest leiti kolm samasse perekonda kuuluvat geeni, mis ei sarnanenud ühegi varem tuntud järjestusega. Geeniperekond avastati seetõttu, et nad kodeerisid vähi antigeene, mis kutsusid esile spontaanse tsütotoksilise (elavate rakkude jaoks mürgise) T-lümfotsüüdi vastuse melanoomipatsientide kudedes. MAGE perekond koosneb suurest hulgast X-kromosoomiga seotud geenidest. (Van der Bruggen jt., 1991)

Esimesele avastatud kasvaja antigeenile anti nimeks melanoomi antigeen 1 ehk MAGE-1 (hiljem sai vastav antigeen nimeks MAGE-A1) (De Plaen jt, 1994). Edaspidi tuvastati veelgi MAGE perekonda kuuluvaid antigeene ning tänapäevaks on leitud 60 MAGE perekonna liiget, millest osa on pseudogeene. Kõigile MAGE valkudele on iseloomulik kõrgelt konserveerunud domään, mida nimetatakse MAGE homoloogiadomääniks (*MAGE homology domain*; MHD). See koosneb 165–171 aminohappest ja on ainus aminohapete regioon, mis on ühine kõigile MAGE perekonna valkudele. (Chomez jt, 2001)

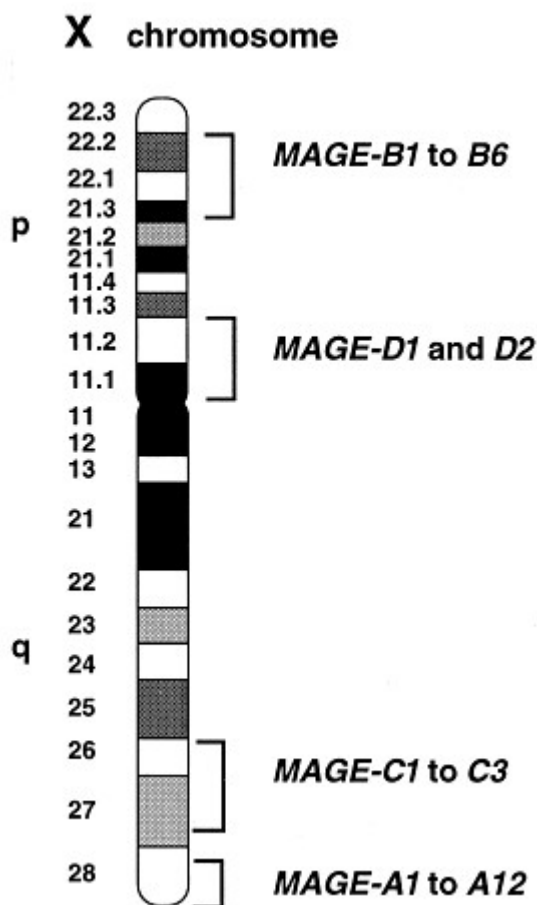
Tänapäeval jagatakse MAGE antigeene kahte suurde rühma – MAGE-I (vähi antigeenid) ja MAGE-II (kõikjalolevad antigeenid) –, sõltuvalt nende koespetsiifilisest avaldumisest, struktuurierinevustest ja asukohast kromosoomis. (Sang jt, 2011)

MAGE-I gruppi kuuluvad perekonnad MAGE-A, MAGE-B ja MAGE-C, mille antigeenid asuvad kõik inimese X-kromosoomis (joonis 1) (De Plaen jt., 1994). MAGE-A perekonna antigeene võib leida Xq28 regioonis (De Plaen jt., 1994), MAGE-B perekonna antigeene Xp21 regioonis (Dabovic jt., 1995) ning MAGE-C perekonna antigeene Xq26-27 regioonis (Lucas jt., 1998). Kokku on MAGE-I rühmas 24 antigeeni: MAGE-A perekonnas 11, MAGE-B perekonnas 9 ja MAGE-C perekonnas 4, lisaks veel pseudogeene.

MAGE-I gruppi kuuluvad antigeenid, eriti MAGE-A antigeenid, aktiveeruvad pahaloomulistes kasvajates, aga on vaigistatud tervetes kudedes, välja arvatud testistes (De Plaen jt., 1994) ning osaliselt platsentas (Chomez jt, 2001) ja trofoblastis (Sang jt, 2011). Organismi arengu jooksul vaigistatakse MAGE-I antigeenide ekspressioon promootor-DNA metülatiooni käigus, aga epigeneetilise reprogrammeerimise jooksul, mis leiab aset paljudes kasvajates, demetüleeritakse MAGE-I promootorid ja kutsutakse esile antigeenide ebanormaalne ekspressioon (Sang jt, 2011). Kõige kõrgem on ekspressioonisagedus



melanoomis ja kopsuvähis, aga MAGE-I antigeene on leitud ka põie-, pea- ja kaelavähist ning vähemal määral rinna- ja eesnäärmevähist (Jungbluth jt., 2000).



*Joonis 1. MAGE-A, MAGE-B, MAGE-C ja MAGE-D geeniklastrite asukoht inimese X-kromosoomis. (Pilt: Lucas jt, 2000)*

Eeltoodu tõttu on MAGE-I grupi antigeenid, eriti MAGE-A perekond, immunoteraapia ideaalsed sihtmärgid. Lisaks on ekspressioonianalüüs pahaloomulistes vähkkasvajates aidanud tuvastada uusi vähi biomarkereid, mis võivad tulevikus kaasa aidata vähi varasemale avastamisele. (Sang jt, 2011)

MAGE-II gruppi kuulub perekond MAGE-D. Selles antigeenide perekonnas on 15 liiget, mille ekspresseerumine organismis ei ole piiratud vähkkasvajatega ega meessugurakkudega (Sang jt, 2011). MAGE-D antigeenid ekspresseeruvad paljudes normaalsetes täiskasvanud somaatilistes kudedes (Chomez jt, 2001) ning loote aju-, maksa- ja neerukoes (Bertrand jt,

2004). X-kromosoomis leidub neid p11.1-11.4 regioonis. Peale ekspressioonimustri erinevad MAGE-D perekonna liikmed teistest MAGE perekondadest ka oma genoomse struktuuri poolest. Geeniperekonna liikmed on inimese juures evolutsiooni jooksul hästi säilinud, lubades oletada, et nad täidavad organismis olulisi funktsioone. Näiteks reageerib MAGE-D1 p75 neurotrofiini retseptoriga ja aitab kaasa närvikasvufaktorist sõltuvale rakkude apoptoosile. MAGE-D1 reageerib ka Dlx/Msx homeodomääni perekonna liikmetega ja reguleerib Dlx5 transkriptsioonifunktsiooni. Huvitava asjaoluna on leitud, et MAGE-D3 COOH-terminali domään on identne trofiiniiniga – valguga, mis on seotud embrüo kinnitumisega emakaseinale. MAGE-D perekonna genoomstruktuur näitab, et üks neist vastab geeniperekonna asutajaliikmele ja teised on retrogeenid, mis on arenenud ühisest eellasgeenist. (Chomez jt, 2001)

### ***1.1.2 MAGE-A perekond***

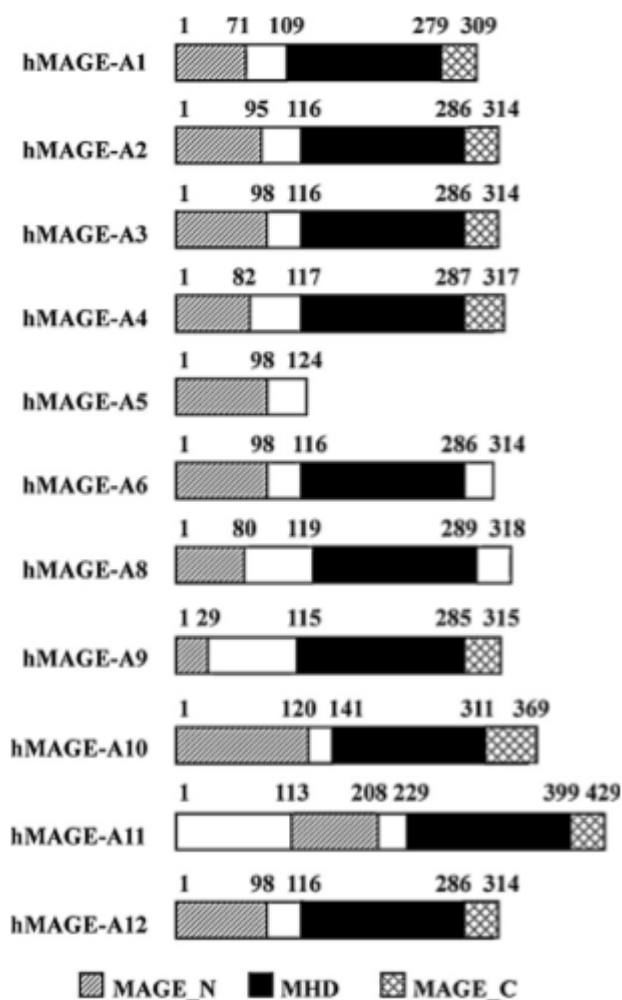
MAGE-A perekonna antigeene on vähi antigeenidest kõige rohkem uuritud. Nad avalduvad mitmesugustes vähkkasvajates, aga nii nende kui ka teiste MAGE-I geenide avaldumine somaatilistes kudedes on allasurutud (Chomez jt, 2001). Kõige silmatorkavam on MAGE-A antigeenide ekspressioon melanoomis, mille järgi on geeniperekond ka oma nime saanud (Alves jt, 2007). MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A6 ja -A12 avalduvad sagedamini kasvaja koes ja rakuliinides. MAGE-A3, -A4, -A8, A10 ja -A11 on tuvastatud platsentas. (De Plaen jt, 1994)

Kuna MAGE-A antigeenid on rangelt kasvajaspetsiifilised ja neid ekspresseeritakse paljudes erinevates vähkkasvajates, asuvad nad vähi immunoteraapia huviorbiidis. Nende tavapärasest ekspressiooni võib kasutada ka kasvajarakkude varaseks tuvastamiseks. (Sang jt, 2011)

MAGE-A antigeeniperekond asub kromosoomi Xq28 regioonis ja selles on 12 liiget: MAGE-A1–MAGE-A12. MAGE-A valgud koosnevad enam kui 300 aminohappest. Valkude toodetud peptiidid võivad seostuda kõigi inimese leukotsüüdi antigeeni tüüpidega ja moodustada komplekse, mida autoloogsed T-lümfotsüüdid ära tunnevad. (De Plaen jt, 1994; Rogner jt, 1995)

MAGE homoloogiadomään, mis on omane kõigile MAGE valkudele (vt ka joonis 2), hõlmab MAGE-A perekonna valkudel ligi 70% valgust. MHD kõrge konserveerumine võib viidata kõigi MAGE-A valkude sarnasele struktuurile ja funktsioonile rakus. (Meek jt, 2012) MHD

bioloogilised funktsioonid on suures osas teadmata, aga selgunud on, et domään võib reageerida paljude regioonidega RING-sõrme E3 ubikvitiini ligaasis, moodustades uusi valgukomplekse ja soodustades seeläbi valgu ubikvitüleerumist (Doyle jt, 2010; Espantman, O'Shea, 2010).



*Joonis 2. Inimese MAGE-A perekonna valkude skemaatiline joonis (MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A5, -A6, -A8, -A9, -A10, -A11, -A12), välja arvatud pseudogeenid (MAGE-A7). Välja on toodud MAGE-NH<sub>2</sub>-terminaalne regioon, MAGE homoloogiaregioon (MHD) ja MAGE COOH-terminaalne regioon (MAGE\_C). Pilt: Sang jt, 2011.*

MAGE-A perekonna funktsioonid rakkudes ja kogu organismis on suures osas teadmata, aga pisut tõendeid on leitud selle kohta, et MAGE-A antigeenidel võib olla inimese vähi arengus suur osa metastaaside tekkel. MAGE-A3 ja MAGE-A4 on mõne vähiliigi biomarkerid ning tulevikus võivad nad aidata praegusest kiiremini diagnoosida näiteks hepatotsellulaarset

kartsinoomi ja selle varjatud hematogeenseid metastaase, rinnavähki ning söögitoru lamerakk-kartsinoomi. (Sang jt, 2011)

Samuti on varasemate uuringute käigus kogunenud üha rohkem tõendeid MAGE-A valkude osalemise kohta rakutsükli regulatsioonis ja apoptoosis. MAGE-A1 võib seostuda proto-onkovaaluga SKI, inhibeerides sel moel transkriptsiooni, ning siduda ja tuua kohale histooni deatsetülaasi 1, represseerides aktiivselt transkriptsiooni (Laduron jt, 2004). Osa MAGE-A antigeeniperekonna liikmetest – MAGE-A1, -A2, -A3 ja A6 – on võimelised suruma alla p53 transaktivatsiooni. Näiteks võib MAGE-A2 seonduda p53-ga ja sundida ka histooni deatsetülaasi 3 liituma MAGE-A2/p53 kompleksiga, vähendades seeläbi tunduvalt p53 transaktivatsioonifunktsiooni (Monte jt, 2006). Tõendeid on ka selle kohta, et MAGE-A3 ekspressioon võib kaitsta vähirakke selle eest, kui rakusiseseid organeid rünnatakse (Morishima jt, 2002). MAGE-A11 seostub androgeeni retseptori NH<sub>2</sub>-terminusega ja suurendab androgeeni retseptori transkriptsioonilist aktiivsust (Bai jt, 2005) ning MAGE-A11 suurenenud ekspressioon soodustab eesnäärmevähi teket (Bai jt, 2008).

### ***1.1.3 MAGE-A4***

MAGE-A4 on 317 aminohappest koosnev valk, molekulmassiga 34,9 kDa (Biocompare). MAGE-A4 ekspressioon on üsna suurel määral näidatud lamerakulises kartsinoomis ning tunduvalt harvem adenokartsinoomis (Peikert jt, 2006; Yakirevich jt, 2003). Valgu täpne funktsioon organismis on teadmata, aga uuringutest on selgunud, et MAGE-A4 võib osaleda apoptoosi reguleerimises: selle ekspressioon suurendab rakkude apoptoosi ja aktiveerib valgu kaspaas-3 ekspressiooni, mis omakorda katalüüsib paljude elutähtsate rakuvalkude lagundamist (Peikert jt, 2006; Porter jt, 1999). MAGE-A4 C-terminaalne fragment kutsub esile nii p53-st sõltuvat kui ka sõltumatut apoptoosi (Sakurai jt, 2001). Eelnev viitab sellele, et valk võib esile kutsuda vähirakkude surma ja muuta kasvajaid tundlikuks apoptootilistele stiimulitele, näiteks kemoteraapilistele agentidele, ning seetõttu toimida tuumorsuppressorvalguna (Peikert jt, 2006). Samuti osaleb MAGE-A4 apoptoosi reguleerimises testistes (Print ja Loveland, 2000). Samas on oletatud ka, et MAGE-A4-l võib olla vähi arengus hoopis onkogeenne roll (Sang jt, 2011).

MAGE-A4 on paljulubav diagnostiline tööriist vähi prognoosimises. Näiteks võib MAGE-A4 aidata tulevikus kaasa hepatotsellulaarse kartsinoomi ja selle varjatud hematogeensete

metastaaside varajasele avastamisele. Lisaks on MAGE-A4 spetsiifiline biomarker nii rinnavähi kui ka lamerakk-kartsinoomi puhul. (Sang jt, 2011)

#### ***1.1.4 MAGE-A10***

MAGE-A10 on tõenäoliselt MAGE-A perekonna kõige immunogeensem antigeen, olles seega väga sobiv immunoteraapia sihtmärk (Mengus jt, 2012). See on rakutuumas esinev valk, mille molekulaarmass on 72 kDa ja mis avaldub normaalsetest kudedest ainult spermatogooniumi rakkudes ja spermatotsüütides (Scanlan jt, 2002; Schultz-Thater jt, 2012) ning vähesel määral platsentas (Rimoldi jt, 1999). Samal ajal ekspresseeritakse MAGE-A10-t mitmesugust liiki vähkides (Mengus jt, 2012), kõige rohkem kopsu-, naha- ja uroteliaalse vähi rakkudes (Schultz-Thater jt, 2010). Melanoomkasvajate analüüsid on näidanud, et MAGE-A10 avaldub sageli koos MAGE-A1-ga. (Rimoldi jt, 1999)

MAGE-A10 molekulaarmass on teiste MAGE-A perekonda kuuluvate valkudega võrreldes üsna suur: kui enamik MAGE-A antigeeniperekonna liikmeid on molekulaarmassiga 45–50 kDa, siis MAGE-A10 molekulaarmass on 72 kDa. Samuti on MAGE-A10-l neli eksonit, samal ajal kui teistel MAGE-A perekonna valkudel, välja arvatud MAGE-A2, on eksoneid ainult kolm. MAGE-A10 neljandal eksonil on pikem 3'-transleerimata regioon kui teistel MAGE-A perekonna liikmetel, mis muudab MAGE-A10 cDNA 0,7 kb pikemaks. (Rimoldi jt, 1999)

## ***1.2 Ekstratsellulaarsed vesiikulid***

Ekstratsellulaarseteks vesiikuliteks nimetatakse membraaniga ümbritsetud partikleid, mis sisaldavad lipiide, valke ja RNA-d (Levy, 2017), ning mida suur osa rakke vabastab rakuvälisesse mikrokeskkonda. Terminit *ekstratsellulaarne vesiikul* kasutatakse kõigi sekreteeritud vesiikulite kohta ning see hõlmab nii eksosoomi, mikrovesiikuleid kui ka apoptootilisi kehakesi. (Kurg jt, 2016)

Kõik ekstratsellulaarsed vesiikulid sisaldavad valke, mida peetakse vesiikuliülesteks markeriteks. Üldiselt on ekstratsellulaarsetes vesiikulites palju tsütoskeleti-, tsütosooli-, kuumašoki- ja plasmamembraanivalke ning lisaks veel valke, mis on seotud vesiikulite transpordiga. Täpne valguprofiil sõltub üsna suurel määral sellest, kus vesiikulid organismis asuvad, millistest rakkudest nad pärit on ja missuguse sekretsioonimehhanismi käigus on nad avaldunud. Samas ei ole üht kindlat markerit, mille abil saaks kõiki ekstratsellulaarsete vesiikulite liike üksteisest eristada. (Yáñez-Mó jt, 2015)

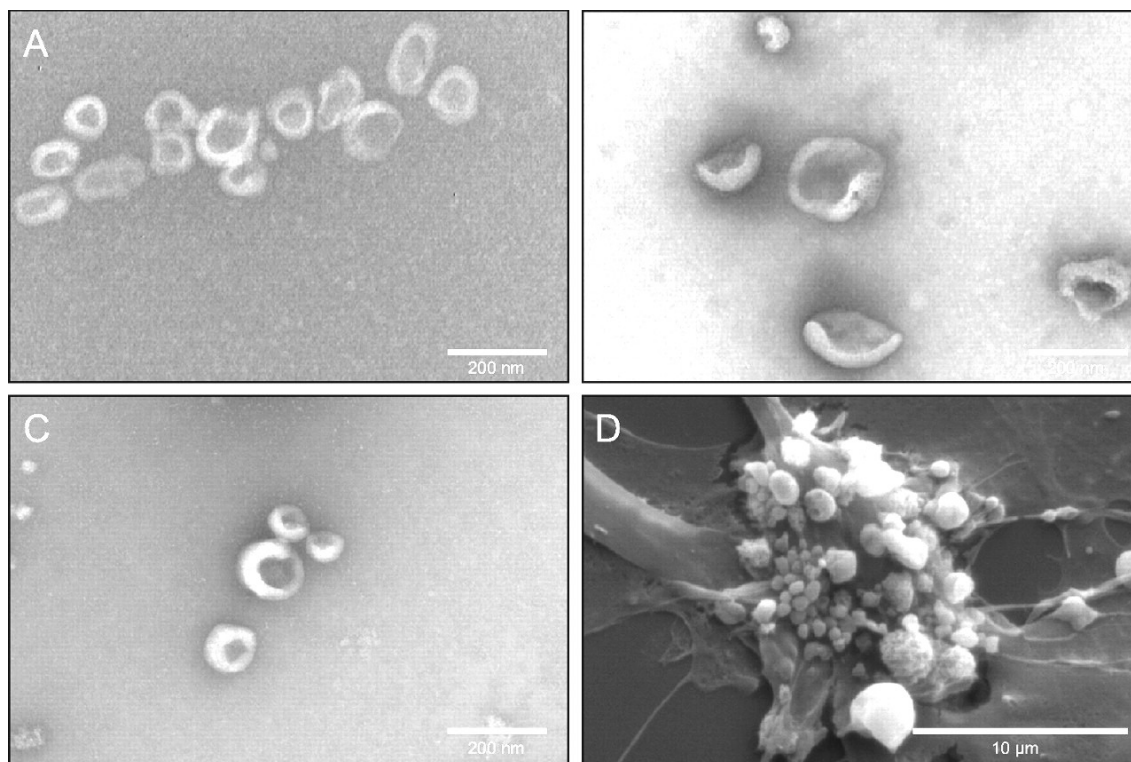
**Eksosoomid** on kõige väiksemad ekstratsellulaarsed vesiikulid, läbimõõduga 30–100 nm ning tihedusega 1,13–1,19 g/ml (van der Pol jt, 2012). Neid leidub mitmesugustes kehavedelikes, näiteks plasmas, seerumis ja rinnapiimas. Eksosoomide sekretsioon leiab aset enamikus rakuliikides, sealhulgas kasvajakudedes, antigeeni tootvates rakkudes, T-rakkudes, tüvirakkudes ning epiteelirakkudes. Nad koosnevad mitmesugustest bioaktiivsetest molekulidest, näiteks valkudest, lipiididest ja nukleiinhapetest, ning võivad seetõttu osaleda keerukamas rakuvahelises kommunikatsioonis kui teised, lihtsama ehitusega ekstratsellulaarsed vesiikulid. (Wahlgren, 2014)

Eksosoomid tekivad raku sees osana endosoomsest rajast, mille tulemuseks on multivesikulaarsete kehade moodustumine (Wahlgren, 2014), ja eralduvad multivesikulaarsetest kehadest endosoomi membraani sissepoole pungumisel (Borges jt, 2013). Nii kaua, kuni vesiikulid asuvad multivesikulaarsetes kehades, nimetatakse neid intraluminaalseteks vesiikuliteks. Kui multivesikulaarne keha seondub välismembraaniga, vabastatakse eksosoomid rakkudevahelisse keskkonda. (Wahlgren, 2014)

Kuna eksosoomid on nii väikesed, on nad võimelised tungima sügavale kudedesse. Nende kergelt negatiivne dzeetapotentsiaal lubab neil kaua ringluses olla. Eelnevad tunnused ning lisaks deformeeritav tsütoskelett ja sarnasus rakumembraanidega muudavad nad ideaalseteks looduslikeks nanokandjateks. (Luan jt, 2017)

**Mikrovesiikulid**, mida mõnikord kutsutakse ka mikroosakesteks, on plasmamembraanis toodetud osakesed, enamasti läbimõõduga 100–1000 nm, mis vabastatakse rakuvälisesse keskkonda plasmamembraani väljapoole pungumisel ja lõhustumisel (Meckes, Raab-Traub, 2011). Neid leidub teadaolevalt kõigis kehavedelikes, aterosklerootilistes naastudes ja konditsioneeritud söötmes. Mikrovesiikulid võivad olla oma harilikust suurusest ka tunduvalt väiksemad (kuni 20 nm), seega võib nende suurus osaliselt kattuda eksosoomide omaga. Mikrovesiikulite täpne tihedus on teadmata, aga tavaliselt on nende isoleerimisel tsentrifuugi pöörete sagedus 10 000 kuni 20 000 g. (van der Pol jt, 2012)

**Apoptootilised kehakesed** on fosfatidüülseriini eksponeerivad vesiikulid, mida rakud vabastavad siis, kui neis toimub apoptoos. Suurim erinevus apoptootiliste kehakeste ja teiste ekstratsellulaarsete vesiikulite vahel on nende suurus: apoptootiliste kehakeste läbimõõt varieerub 1 ja 5 µm vahel. Apoptootiliste kehakeste tihedus on 1,16–1,26 g/ml, mis kattub osaliselt eksosoomide omaga, ja nende morfoloogia on tavaliselt heterogeensem kui teistel rakus toodetud vesiikulitel. Tavaliselt vabaneb apoptootilistest rakkudest kaht immunoloogiliselt erinevat tüüpi apoptootilisi kehakesi: need, mis on pärit plasmamembraanist, sisaldavad DNA-d ja histoone ning need, mis vabanevad endoplasmaatilisest retiikulumist, ei sisalda DNA-d ega histoone, kuid neis on ebaküpsed glükoepitoobid. Sellist kummalist erinevust peetakse süsteemsete autoimmuunhaiguste peapõhjuseks. (van der Pol jt, 2012)



**Joonis 3. Eri tüüpi eukarüootsetes rakkudes tekkinud vesiikulid.** A – eksosoomid, diameeter <100 nm; B – mikrovesiikulid, diameeter >100 nm; C – eksosoomid või membraanipartiklid, diameeter <100 nm; D – apoptootiliste kehakeste vabanemine inimese nabaveenist. (Pilt: van der Pol jt, 2012)

### ***1.2.1 Ekstratsellulaarsete vesiikulite ülesanded ja võimalikud kasutusala meditsiinis***

Ekstratsellulaarsed vesiikulid täidavad olulist osa nii füsioloogilistes kui ka patofüsioloogilistes protsessides. Nad osalevad valkude, nukleiinhapete ja teiste biomolekulide transpordis rakkude ja kudede vahel, olles kaasatud rakkudevahelisse kommunikatsiooni- (Poste, Nicolson, 1980), koagulatsiooni- (Wolf, 1967), tumorigeneesi- (Muralidhan-Chari jt, 2010) ja immuunvastuseprotsessi (Théry jt, 2009). Rakkude vahel liikudes on ekstratsellulaarsed vesiikulid võimelised minema mööda immuunaktivatsioonist ja nad on keerukates füsioloogilistes tingimustes üsna stabiilsed. (Fuhrmann jt, 2017)

Mikrovesiikulid ja eksosoomid kannavad rakkudesse ka mikro-RNA-d (miRNA) ja informatsioonilist RNA-d (ingl. k *messenger RNA*, mRNA) (Wahlgren, 2014; Yáñez-Mó jt, 2015). Inimese organismis olevad ekstratsellulaarsed vesiikulid sisaldavad üle 200 erineva mRNA, millest suurem osa on seotud rakkude jagunemise, transkriptsiooni, paljunemise ja immuunregulatsiooniga. Ekstratsellulaarsetes vesiikulites oleva mRNA koostis sõltub raku



füsioloogilisest seisundist ja stressist. Sellel võib olla osa kudede homeostaasi säilitamises ja rakkude funktsionaalse seisundi sünkroonimises, kuna katsetega on kindlaks tehtud, et normaalolukorras sekreteeritud vesiikulite mRNA erineb stressiolukorras sekreteeritud vesiikulite omast. Lisaks reguleerib mRNA koostist kardiomiotsüütide kasvufaktori stimulatsioon ja glioomirakkude hüpoksia. (Yáñez-Mó jt, 2015)

miRNA kanda on oluline osa geeniekspressiooni reguleerimises. Lisaks võivad nad toimida tuumorsupressorina. (Yáñez-Mó jt, 2015)

Ekstratsellulaarseid vesiikuleid ei kasuta infokandjatena mitte ainult eukarüootsed rakud, vaid nad võivad ka osaleda kommunikatsioonis bakterirakkude vahel. Bakteriaalsed ekstratsellulaarsed vesiikulid on tugevalt seotud patogeenide tekitatud infektsioonidega, nad vahendavad peremeesraku immuunaktivatsiooni ja kannavad ühest rakust teise resistentsusgene või virulentsusfaktoreid. (Fuhrmann jt, 2017)

Kuna ekstratsellulaarsed vesiikulid kannavad looduslikult infot rakkude vahel, on keerukates tingimustes stabiilsed ja seostuvad spetsiifiliselt immuunkompetentsete rakkudega, võivad nad olla ideaalne materjal, millele tuginedes vaktsiine välja töötada. Samuti võivad ekstratsellulaarsed vesiikulid olla mitmesuguste patoloogiliste seisundite, näiteks vähi või sepsise biomarkerid. Võimalik, et ekstratsellulaarseid vesiikuleid saab kasutada vähi ja põletike selektiivses teraapias. (Fuhrmann jt, 2017)

Kõige rohkem on ekstratsellulaarsetest vesiikulitest uuritud eksosoomide võimalikke ülesandeid organismis. Eksosoomid on kaasatud rakkudevahelisse kommunikatsiooni, sõltumata kaugusest rakkude vahel (Borges jt, 2013). Nad sisaldavad ja kaitsevad spetsiifilisi mRNA-sid, regulaatorseid miRNA-sid, lipiide ja valke. Seega on nad olulised rakkudevahelise kommunikatsiooni osalised, vajamata kommunikatsiooni toimumiseks otsest kontakti rakkude vahel. (Luan jt, 2017) Kuna eksosoomid avalduvad enamikus rakuliikides ja neid leidub paljudes kehavedelikes, on väga tõenäoline, et nad osalevad paljudes normaalsetes füsioloogilistes protsessides. Samas võib neil olla osa ka patogeenide, näiteks viiruste ja prioonide levikus, ning vähi levikus, kuna nad saavad mõjutada rakkude proliferatsiooni, inflammatsiooni ja kasvaja arengut. (Wahlgren, 2014)

Tõendeid on ka selle kohta, et tüvirakkudest pärit eksosoomide täita on oluline osa kudede regeneratsioonis pärast müokardiaalselt isheemiat: mesenhümaalsetest tüvirakkudest isoleeritud eksosoomid on võimalised vähendama müokardiaalsest isheemiast tingitud vigastusi ja võimalik, et neid saab kasutada müokardiaalse infarkti teraapias (Lai jt, 2011).

Osa uuringutulemusi viitab sellele, et tüvirakkudes eralduvad peamiselt niisugused eksosoomid, mis pidurdavad apoptoosi, ergutavad proliferatsiooni ja soodustavad neovaskularisatsiooni ning kaitsevad seeläbi arenevaid rakke (Lai jt, 2010). Kasvajates toodetud eksosoomidel võib olla immunosupressiivne toime, näiteks võivad melanoomirakud sekreteerida Fas-ligandit kandvaid eksosoomi, mis algatavad T-raku apoptoosi ja kaitsevad kasvajakku rünnakute eest (Andreola jt, 2002). Kasvajarakkudest pärit eksosoomid võivad ka pärssida lümfotsüütide paljunemist (Clayton jt, 2007). Lisaks kannavad eksosoomid viiruseid. Näiteks on ühes uuringus selgitatud, kuidas eksosoomid ebaküpsetest dendriitrakkudest aitavad kaasa HIV levikule, kandes viiruspartikleid CD4+T rakkudesse endosoomse raja kaudu, mis ei lase immuunsüsteemil viirust avastada (Wiley, Gummuluru, 2006). Närvirakkudest pärit eksosoomid on kaasatud Parkinsoni tõve arengusse, sest nad kannavad valku, mida on seostatud haiguse levikuga (Emmanouilidou jt, 2010). Ajast isoleeritud eksosoomid on andnud infot eksosoomide osa kohta neurodegeneratiivsetes haigustes: eksosoomid on osalised Alzheimeri tõve arengus, dementsuse tekkes, amüotroofse lateraalse skleroosi arengus ja frontotemporaalse ajusagara taandarengus, inimahvi immuunpuudulikkusviirusest tingitud ajutõve tekkes ning skisofreesias ja bipolaarses häires (Levy, 2017).

Ekstrasellulaarsetest vesiikulitest võivad eksosoomid kõige suurema tõenäosusega leida rakendust meditsiinivaldkonnas. Kuna eksosoomidel on palju erinevaid funktsioone, saab neid kasutada mitmesuguste haiguste biomarkeritena. Selleks võib eksosoomi eraldada näiteks plasmast või uriinist. Eksosoomid on rakkudes toodetud, seetõttu on võimalik, et nad peegeldavad haigusspetsiifilisi mustreid, sealhulgas valkude ja RNA sisaldust, mis muudab nad tõenäolisteks diagnostilisteks tööriistadeks. Uriinist isoleeritud eksosoomi on juba kasutatud eesnäärmevähi diagnoosimiseks. (Wahlgren, 2014)

Eksosoomid võivad tulevikus leida kasutust ka nanokandjatena kliinilistel eesmärkidel. Selleks, kuidas eksosoomi ravimitega siduda, on mitmesuguseid võimalusi. Üks variant on inkubeerida eksosoomi koos ravimitega ja lasta ravimitel koos kontsentratsioonigradiendiga eksosoomidesse sulanduda. Samuti on võimalik töödelda doonorrakke ravimitega, et nad sekreteeriks juba vastavat ravimit kandvaid eksosoomi. Nende kahe meetodi negatiivseks küljeks on aga madal efektiivsus. (Luan jt, 2017)

Suurema efektiivsuse tagamiseks võib eksosoomi sonikeerida – segada nad ravimite või valkudega ja neid samal ajal homogeniseerimissondi abil ultraheliga töödelda. Eksosoomi- ja

ravimisegu võib asetada ka 100–400 nm poormembraanidega lipiidiekstruuderisse, kus eksosoomide membraan lõhutakse ja segatakse ravimitega. Eksosoomide ja ravimeid saab samuti segada külmutamis- ja sulatamistsüklite abil, aga see ei anna nii häid tulemusi kui eelnevad meetodid. Lisaks on võimalik elektroporatsioon – elektrivälja abil tekitatakse eksosoomi membraani väikesed ajutised poorid, kust ravimid või nukleotiidid eksosoomi siseneda saavad. Rakendada võib ka inkubeerimist membraani permeabilisaatoritega, mis muudavad eksosoomi membraani ravimite jaoks kergemini läbitavaks, aga hiljem tuleks eksosoomid puhastada, et vabaneda mürgistest permeabilisaatorijääkidest. Klikk-keemia meetodite abil oleks võimalik kinnitada vajalikke molekule otse eksosoomide pinnale ning sarnaselt töötaks ka antikehade kasutamine. Kaks viimast meetodit oleksid ilmselt parimad, kuna need on kiired, efektiivsed ja võrdlemisi lihtsad. (Luan jt, 2017)

### ***1.2.2 Ekstratsellulaarsete vesiikulite eraldamine ja puhastamine***

Kuna kehavedelikud on bioloogiliselt kompleksed, on ekstratsellulaarsete vesiikulite isoleerimine väga keeruline, ning oma väikeste mõõtmete tõttu ei saa vesiikuleid tavapäraste tuvastamismeetoditega eraldada (van der Pol jt, 2012). Vesiikulite eraldamiseks on küll mitmesuguseid meetodeid, aga ükski neist ei taga täielikku puhtust (Wahlgren, 2014).

Tavaliselt isoleeritakse vesiikuleid kehavedelikest ja rakukultuuri supernatandist, kasutades diferentsiaalset tsentrifuugimist. Selle protsessi käigus kasutatakse tsentrifugaaljõudu soovitud aine, näiteks vesiikulite sadestamiseks. Eri sorti vesiikulite separatsioon sõltub vesiikulite suurusest ja tihedusest: suuremad ja tihedamad koostisosad liiguvad pöördteljest eemale ning väiksemad ja hõredamad telje poole. Diferentsiaalne tsentrifuugimine koosneb mitmest sammust, kusjuures igal sammul suurendatakse pöörete arvu, et eraldada aina väiksemad ja hõredamad koostisosad. Tavaliselt eemaldatakse rakud ja rakujäätmek 200–1500 g juures, üle 100 nm suurused vesiikulid 10 000–20 000 g juures ning alla 100 nm suurused vesiikulid 100 000–200 000 g juures. (van der Pol jt, 2012)

Suuremad membraanivesiikulid ja kuhjunud valgud eemaldatakse hilisema filtreerimise käigus. Puhtama isolaadi saamiseks võib tsentrifuugimise saadusi pesta fosfaadiga puhverdatud soolalahuses või fraktsioneerida need läbi tihedusgradiendi – sahharoosipadja. Tihedusgradient eemaldab lipiidipõhised vesiikulid ja valgujäägid. (Wahlgren, 2014) Kuna

vesiikulid on aga üsna heterogeensed ja erinevused nende tiheduse vahel on väikesed, on eri vesiikulitüüpe tiheduse alusel üksteisest eristada väga keeruline (van der Pol jt, 2012).

Vesiikuleid võib eraldada kuni 10-nanomeetrise täpsusega, kasutades liikumisvälja fraktsioneerimise meetodit (ingl. k *flow field-flow fractionation*). See on tehnika, mis fraktsioneerib partiklid, tuginedes nende difusiooniomaduste erinevustele. Liikumisvälja fraktsioneerimise meetodiga ei rakendata partiklitele nii suurt jõudu kui tsentrifuugimise juures, mis vähendab kahjustusvõimalusi. Meetod ei ole aga laialdast kasutust leidnud, sest see eeldab seadmete ulatuslikku optimeerimist ja on võrdlemisi kallis. (van der Pol jt, 2012)

Samuti võib vesiikuleid isoleerida immunoafiinsus-kromatograafia abil, kasutades antikehadega kaetud beads'e. Kuna vesiikulite populatsioon on mitmekesine ja erineb rakutüübist sõltuvalt, võib aga juhtuda, et sellise meetodiga isoleeritakse ainult üks alampopulatsioon. Lisaks on ekstratsellulaarseid vesiikuleid võimalik isoleerida filtratsioonimeetodite abil või kasutades antikehadega kaetud mikrofluidisaatorit, mis juhitakse vesiikulispetsiifiliste valkude vastu. (Wahlgren, 2014)

## **2 EKSPERIMENTAALNE OSA**

### ***2.1 Töö eesmärgid***

Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudis on algatatud melanoomi antigeenide uuringute projekt, mille üheks osaks on uurida melanoomi antigeenide MAGE-A4 ja MAGE-A10 ekspresseerumist ekstratsellulaarsetes vesiikulites. On püstitatud hüpotees, et MAGE-A4 ja MAGE-A10 valgud lülitatakse rakust sekreteeritavate ekstratsellulaarsete vesiikulite koosseisu.

Käesoleva uurimistöö eesmärgiks on selgitada välja, kas rakkudesse sisestatud MAGE-A4 ja MAGE-A10 valgud avalduvad ekstratsellulaarsete vesiikulite koostises.

## **2.2 Materjalid ja metoodika**

### **2.2.1 Kasutatud plasmiidid**

Katsetes kasutati melanoomispetsiifilisi antigeene MAGE-A4 ja MAGE-A10. Plasmiidid pQM-MAGE-A4 ja pQM-MAGE-A10 on saadud Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudist, Reet Kure käest.

Plasmiidide paljundamiseks kasutati *Escherichia coli* tüve DH5 $\alpha$ . Transformeeritud bakterirakke kasvatati LB söötmes ampitsilliini selektsiooni all lõppkontsentratsiooniga 100  $\mu$ l/ml. Plasmiidid eraldati bakterirakkudest *NucleoBond*<sup>®</sup> *Midi Kit*-iga (*Clontech*) tootja protokoll järgi.

### **2.2.2 Rakuliinid**

Uurimistöös kasutati rakuliine COP5EBNA, HEK293 ja U2OS. COP5EBNA on hiire fibroplasti rakud, milles ekspresseeritakse Epstein-Barr'i viiruse tuumaantigeeni. HEK293 on inimese embrüonaalsed rakud ning U2OS inimese luuvähi rakud. Rakke kasvatati IMDM söötmes (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*), mis sisaldas ka L-glutamiini ja 25 mM HEPES puhvrit. Söötmele oli lisatud 10% veise loote seerumit (FCS) ning antibiootikume penitsilliin (100 U/ml) ja streptomütsiin (100 ng/ml). Rakke kasvatati 37° juures 5% CO<sub>2</sub> keskkonnas (*Galaxy R CO2 Incubator*).

### **2.2.3 Antikehad**

Käesolevas uurimistöös kasutati nii Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudis (TÜTI) valmistatud antikehasid kui ka kommertsiaalseid antikehasid. Primaarsetest antikehadest olid kasutusel anti-MAGE-A4, anti-MAGE-A10, anti-TSG101, anti-beeta-aktiin, anti-alfa-tubuliin, anti-QBP1 ja anti-RPS6. Sekundaarsetest antikehadest kasutati goat-anti-rabbit ja goat-anti-mouse antikehi (Lab AS, Eesti). Optimaalsed kasutatud antikehade kontsentratsioonid on ära toodud allolevas tabelis (tabel 1).

*Tabel 1. Uurimistöös kasutatud primaarsed ja sekundaarsed antikehad.*

<b>Antikeha</b>	<b>Western blot kontsentratsioon</b>	<b>Immunofluorestsents kontsentratsioon</b>
<b>Primaarsed antikehad</b>		
anti-MAGE-A4 (TÜTI)	1:4000	1:500
anti-MAGE-A10 (TÜTI)	1:2000	—
anti-TSG101 ( <i>Anti-TSG101 antobody produced in rabbit;</i> Sigma-Aldrich)	1:4000	—
anti-beeta-aktiin ( <i>Monoclonal Anti-<math>\beta</math>-Actin antibody produced in mouse;</i> Sigma-Aldrich)	—	1:200
anti-alfa-tubuliin ( <i>Monoclonal Anti-<math>\alpha</math>-Tubulin antibody produced in mouse;</i> Sigma-Aldrich)	—	1:1000
anti-QBP1 ( <i>C1QBP (B-6): sc-271201;</i> Santa Cruz Biotechnology, INC)	—	1:50
anti-RPS6 ( <i>Ribosomal Protein S6 (C-8): sc-74459; Santa Cruz Biotechnology, INC)</i>	—	1:50
anti-fibronektiin ( <i>Fibronectin (EP5): sc-8422;</i> Santa Cruz Biotechnology, INC)	—	1:50
<b>Sekundaarsed antikehad</b>		
GAR-goat-anti-rabbit (Lab AS)	1:10 000	—
GAM-goat-anti-mouse (Lab AS)	1:10 000	—

anti-mouse Alexa Fluor 488 (Invitrogen)	—	1:1000
anti-mouse Alexa Fluor 568 (Invitrogen)	—	1:1000

#### **2.2.4 Eukariootsete rakkude transfekterimine**

Plasmiidide viimiseks rakkudesse kasutati elektroporatsiooni meetodit. Rakud koguti 100 mm läbimõõduga 80% konfluentsuseni kasvanud koekultuuri tassidelt: sööde aspireeriti ja rakke pesti 2–3 ml PBS-ga. Selle järel eemaldati rakud tassilt 1–2 ml trüpsiinilahusega (0,05% trüpsiin, 0,02% EDTA PBS-s, *GE Healthcare*) ja kanti tsentrifuugitopsi, kuhu oli lisatud trüpsiiniga võrdsel hulgal IMDM söödet. Rakke tsentrifuugiti 5 minutit 1000 rpm temperatuuril 20°C (*Eppendorf centrifuge 5810R*). Supernatant aspireeriti ja rakkudele lisati 250 µl söödet ühe poratsiooni kohta. pH-d hoiti 5mM BesNa puhvri abil (pH=7,5), mida kasutati 1ml söötme kohta 5 µl 1M. Elektroporatsiooni küvetti pandi 5 µl *carrier* DNA-d (lõhe sperma DNA) ja vajalikul hulgal uuritavat DNA-d. Need segati 250 µl rakususpensiooniga.

Elektroporatsioon tehti *BioRad Gene Pulser II* aparaadiga 975 µF mahtuvuse juures. COP5EBNA rakke poreeriti 230 V pinge juures, HEK293 rakke 240 V pinge juures ja U2OS rakke 220 V pinge juures. Poreeritud rakud kanti 15-milliliitristesse koekultuuri tuubidesse, millesse oli eelnevalt pandid 3 ml söödet, ning neid tsentrifuugiti 5 minutit 1000 rpm temperatuuril 20°C (*Eppendorf centrifuge 5810R*). Supernatant aspireeriti, rakud resuspendeeriti 1ml IMDM söötmes ja kanti 100 mm läbimõõduga koekultuuri tassidele, mis sisaldasid juba eelnevalt 8 ml söödet. Elektroporeeritud rakke kasvatati 48 tundi temperatuuril 37°C 5% CO<sub>2</sub> keskkonnas (*Galaxy R CO<sub>2</sub> Incubator*).

#### **2.2.5 Ekstratsellulaarsete vesiikulite puhastamine**

Ekstratsellulaarsed vesiikulid eraldati tsentrifuugimise teel. Eelnevalt valmistati ette sööde: veise seerumit tsentrifuugiti (FSC) neli tundi 100 000 g juures, et eksosoomidest vabaneda, seerum filtreeriti ja lisati söötmele. Rakke kasvatati pärast transfektsiooni eksosoomivaba seerumit sisaldavas söötmes 48 tundi, seejärel koguti sööde ja sellest eraldati ekstratsellulaarsed vesiikulid.



Vesiikulite eraldamiseks tsentrifuugiti neid esialgu 300 g 5 minuti jooksul, 4°C juures (*Eppendorf centrifuge 5810R*), et eemaldada söötmes olevad surnud rakud ja nende tükid. Teises etapis tsentrifuugiti vesiikuleid 2000 g 20 minutit, 4°C juures (*Eppendorf centrifuge 5810R*). Selles etapis sadestati söötmes olevad apoptootilised kehad ja suuremad membraansed kompleksid ning ekstratsellulaarsed vesiikulid. Sade (2K pellet) suspendeeriti 200 µl PBS-s. Seejärel tsentrifuugiti vesiikuleid 16 500 g 20 minutit 4°C juures (ultratsentrifuug SW28), et eraldada suuremad ekstratsellulaarsed vesiikulid ehk mikrovesiikulid. Sade (16k pellet) suspendeeriti 200 µl PBS-s. Viimases etapis tsentrifuugiti vesiikuleid 120 000 g 70 minuti jooksul 4°C juures (ultratsentrifuug SW28). Eraldusid eksosoomid. Sade (120k pellet) suspendeeriti 200 µl PBS-s.

Ekstratsellulaarsete vesiikulite puhastamiseks söötme ja seerumi jääkidest viidi teises ja kolmandas tsentrifuugimisetapis eraldunud sademe (2K ja 16K pellet) ruumala PBS-ga kuni 1 ml-ni. Sadet tsentrifuugiti jahutusega lauatsentrifuugiga 17 000 g 15 minutit ning suspendeeriti seejärel 100 µl PBS-s. Neljandas tsentrifuugimisetapis eraldunud sade (120K pellet) suspendeeriti 3 ml PBS-s ja tsentrifuugiti ultratsentrifuugiga (SW55) 120 000 g 1,5 tunni jooksul. Sade suspendeeriti 100 µl PBS-s.

Rakkude analüüsi jaoks pesti rakke plaadil PBS-ga ja eemaldati plaadilt 1 ml PBS/EDTA-ga. Järgnevalt suspendeeriti rakud, kanti eppendorfi tuubidesse ja neid suspendeeriti 5 minutit 4000 rpm. Eraldunud sade suspendeeriti 1 ml PBS-s ja ekstratsellulaarsete vesiikulite hulk näidati spektrofotomeetriga (*Thermo Scientific NanoDrop 1000*).

### **2.2.6 Valguforees ja Western blot analüüs**

Selleks, et uuritavaid valke visualiseerida, lahutati need SDS polüakrüülamiidgeelis (10% kontsentreeriv geel ja 6–15% lahutav geel) elektroforeesi (*SDS-Page*) teel. Geelile kanti 2 µg valku. Kasutati 8%, 10% ja 12% akrüülamiidgeele ja SDS jooksupuhvrit (125 mM Tris, 960 mM glütsiin, 0,5% SDS). Alguses foreesiti valke 100 V pingel ning kui nad jõudsid geeli lahutavasse osasse, tõsteti pinget 150 V-ni.

Valgud kanti geelist üle PVDF (*polyvinylidene fluoride*) filtrile (*Immobilon-P Millipore 0,45 µm*) poolkuiva ülekande abil (*Semi-Trans-Blotter; Bio-Rad Manufactory*). Ülekanne tehti pingel 15 V. Aeg sõltus geelide arvust: ühe geeli ülekanne kestis 30 minutit ja kahe geeli samaaegne ülekanne 40 minutit. Pärast seda blokeeriti filter temperatuuril 4°C kas 30 minutit

loksutil või üleöö, kasutades blokeerimislahust (TBS; 0,05% Tween; 2% lõss). Melanoomispetsiifiliste antigeenide detekteerimiseks kasutati uuritavate antigeenide spetsiifilisi antikehi. Inkubeerimislahusesse (TBS; 0,05% Tween 20; 2% lõss) lisati primaarne antikeha sobivas kontsentratsioonis (tabel 1) ja inkubeeriti 1 tund loksutil. Seejärel pesti filtrit kolm korda 10 minutit Westerni pesulahuses (20 mM Tris, pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20). Filter inkubeeriti 1 tund loksutil inkubeerimislahuses, kuhu oli vastavalt primaarsele antikehale lisatud HRP-ga konjugeeritud sekundaarne antikeha lahjendusega 1:10 000. Lõpuks pesti filtrit kolm korda 10 minutit Westerni pesulahusega ja viidi läbi ilmutamisreaktsioon (*Amersham<sup>TM</sup>, ECL<sup>TM</sup> Western Blotting Detection Reagents, Healthcare*) vastavalt tootja protokollile. Signaal visualiseeriti autoradiograafiliselt *Fuji* röntgenfilmile.

### ***2.2.7 Fluorestsents-aktiveeritud rakusorteerimine (FACS)***

10 µl latekskerakestele lisati 10 µg ekstratsellulaarsete vesiikulite partikleid (totaalvalgu järgi) ja saadud segu inkubeeriti toatemperatuuril 15 min. Sellele lisati PBS, nii et lõppmahuks oli 1 ml, ning inkubeeriti 4°C juures üleöö pöörlejal. Pärast seda lisati segusse 50 µl 2M glütsiini, et saada 100 mM lahus, mida inkubeeriti 30 minutit toatemperatuuril. Järgnevalt tsentrifuugiti lahust 4°C juures 5 minuti jooksul 4000 rpm ning aspireeriti supernatant. Ekstratsellulaarseid vesiikuleid pesti kaks korda 0,5 ml PBS/0,5% BSA lahusega ja tsentrifuugiti 4000 rpm 4°C juures 5 minutit. Supernatant aspireeriti.

Ekstratsellulaarsed vesiikulid resuspendeeriti 100 µl PBS/0,5% BSA lahuses, millesse oli lisatud primaarset antikeha kontsentratsiooniga 1µg/ml, ning inkubeeriti laual 40 minutit 4°C juures. Järgnevalt pesti proove kaks korda 150 µl PBS/0,5% BSA-s ja tsentrifuugiti 5 minuti jooksul 4000 rpm temperatuuril 4°C. Supernatant aspireeriti. Seejärel suspendeeriti proovid taas 100 µl PBS/0,5% BSA-s, millesse oli lisatud Alexa488 fluorokroomiga konjugeeritud sekundaarset antikeha kontsentratsiooniga 1µg/ml. Proove inkubeeriti 30 minutit 4°C juures, tsentrifuugiti 5 minuti jooksul 4°C juures 4000 rpm ja aspireeriti supernatant. Järgnevalt pesti proove kaks korda 150 µl PBS/0,5% BSA-s ja tsentrifuugiti 4000 rpm 5 minuti jooksul 4°C juures. Supernatant aspireeriti ja suspendeeriti 300 µl PBS/0,5% BSA-s. Proovid loeti sisse LSR II-ga (*BD<sup>TM</sup> LSR II*).

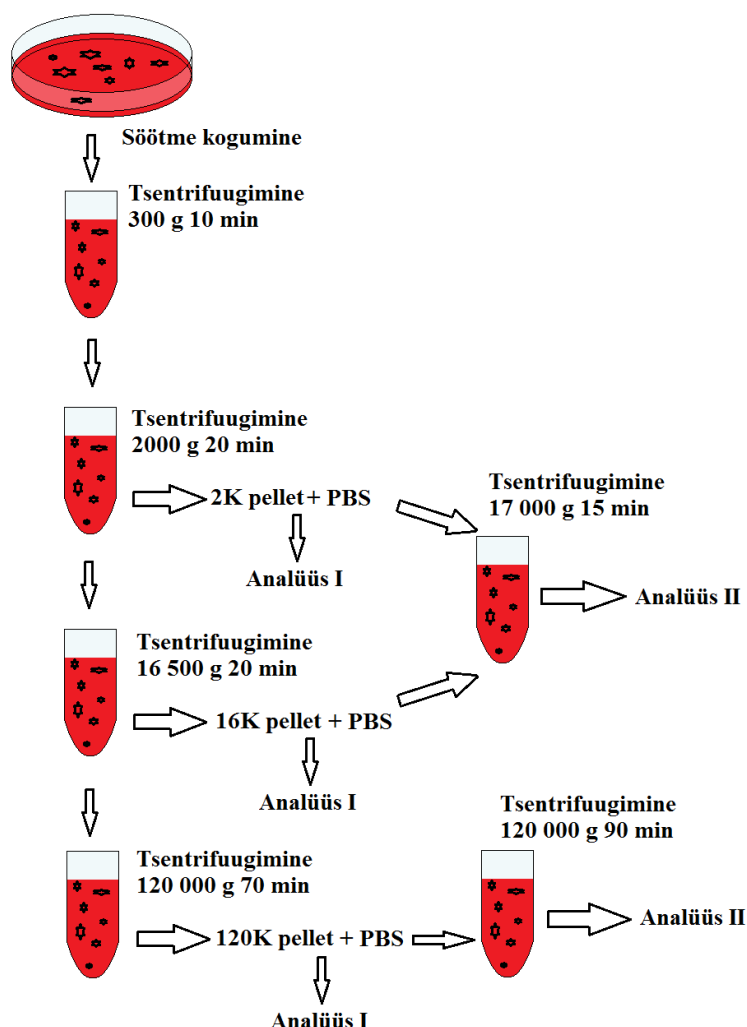
### **2.2.8 Immunofluorestsentsanalüüs**

Immunofluorestsentsanalüüsi tarvis pesti rakke PBS-ga 3x5 minutit. Seejärel fikseeriti rakud 4% PFA/PBS-s 5–10 minutit ja neid pesti PBS-ga 3x5 minutit. Rakkude permeabiliseerimiseks kanti klaasidele 1 ml 0,5% Triton X-100 PBS-s, rakke inkubeeriti 5 minutit ja pesti PBS-ga 3x5 minutit. Järgnevalt blokeeriti rakud 1 ml BSA/PBS-s (BSA kontsentratsioon oli 2,5 mg/ml kohta) 30 minutit loksutil (125 mg 50 ml Falconi kohta).

Alusklaasidele kanti umbes 100 µl lahust (BSA/PBS ja antikeha) ning seda inkubeeriti 1 tund ja pesti PBS-ga 3x5 minutit. Klaasidele lisati sekundaarne antikeha (anti-mouse Alexa-Fluor 488) kontsentratsiooniga 1:1000, antikehi inkubeeriti 1 tund ja pesti PBS-ga 3x5 minutit. Lõpuks kanti alusklaasidele 7 µl sulanduslahust (*SlowFade Gold DAPI*, *Invitrogen*). Rakud visualiseeriti ja pildistati Zeiss 710 konfokaalmikroskoobiga.

## 2.3 Tulemused

### 2.3.1 Ekstratsellulaarsete vesiikulite genereerimine ja puhastamine

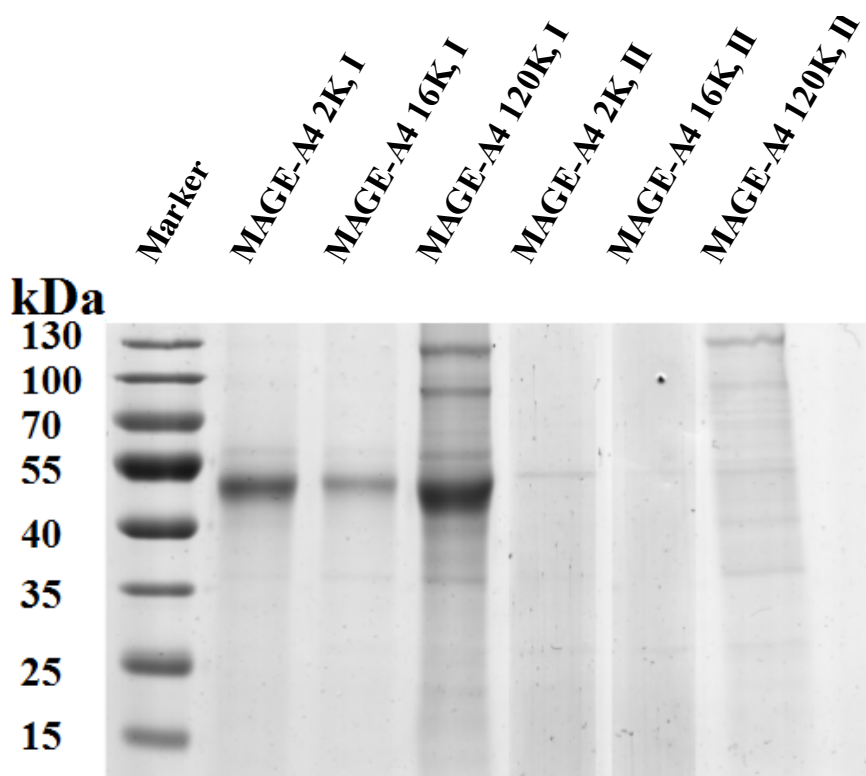


Joonis 1. Skeem ekstratsellulaarsete vesiikulite puhastamise etappidest. Ekstratsellulaarsed vesiikulid läbisid esialgu neli tsentrifuugimist. Teise, kolmanda ja neljanda tsentrifuugimisetapi sademega teostati esimene analüüs. Teise analüüsi jaoks suspendeeriti teise, kolmanda ja neljanda tsentrifuugimisetapi sade PBS-s ning tsentrifuugiti uuesti.

Ekstratsellulaarsete vesiikulite genereerimiseks transfecteeriti hiire fibroblasti rakke COP5 MAGE-A4 ja MAGE-A10 plasmiididega pQM-MAGE-A4 ja pQM-MAGE-A10. Transfecteeritud rakkudel lasti kasvada ning ekspresseerida MAGE-A4 ja MAGE-A10 antigeene 48 tunni jooksul. Seejärel eemaldati rakkudelt sööde ja sellest eraldati tsentrifuugimise teel ekstratsellulaarsed vesiikulid. Uuritavad valgud visualiseeriti valguforeesi käigus ja tehti *Western blot*'i analüüs. Selleks, et ekstratsellulaarseid vesiikuleid

söötmes leiduvatest liigsetest valkudest (peamiselt albumiinist) ja seerumijääkidest puhastada, suspendeeriti tsentrifuugimise käigus eraldunud sade PBS-s, tsentrifuugiti uuesti, suspendeeriti seejärel taas PBS-s ja analüüsiti *Western blot*-iga. Ekstratsellulaarsete vesiikulite eraldamine ja puhastamine söötme jääkidest toimus ülaloleva skeemi alusel (joonis 1).

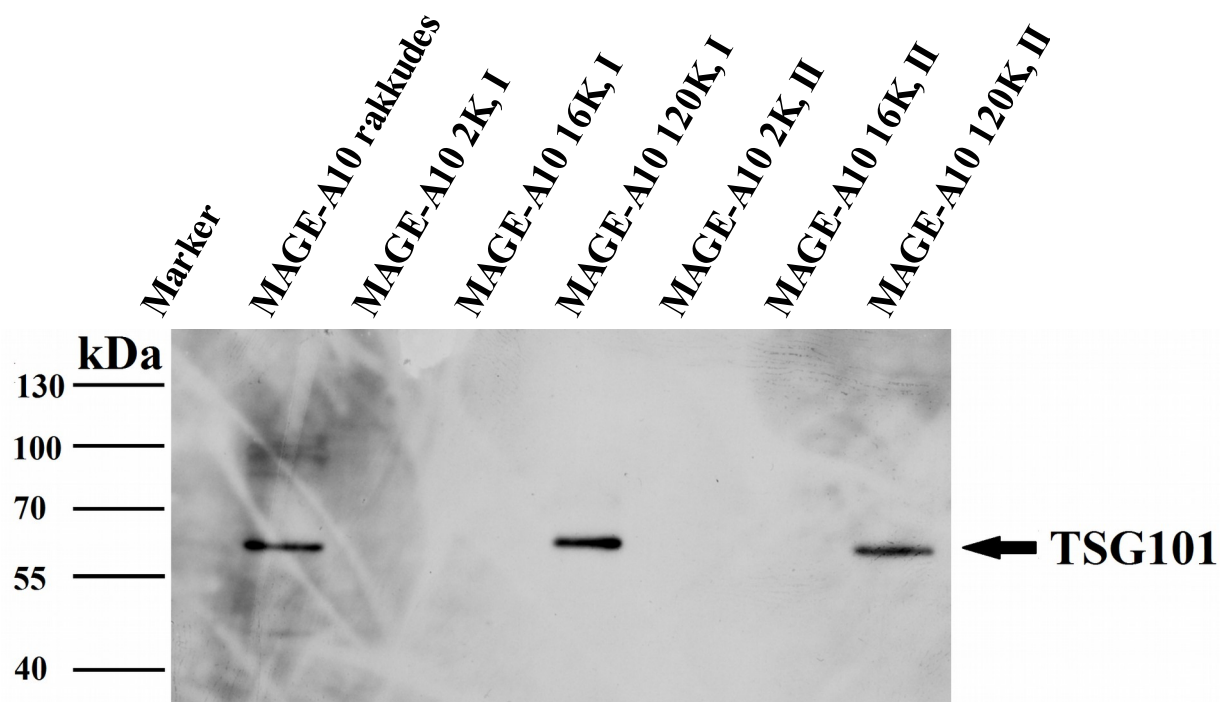
Joonisel 2 on näidatud *Page Blue Protein Stain*-iga värvitud ekstratsellulaarsed partiklid enne ja pärast PBS pesuetappi. Kui võrrelda proove enne ja pärast korduspuhastamist, võib märgata, et PBS-ga puhastamise ja tsentrifuugimise järel on osadevalkude hulk vesiikulites vähenenud.



Joonis 2. MAGE-A4 valkude värvimine *Page Blue Protein Stain*-iga. Elektroforeesil kanti iga proovi geeli radadele 5 µg markerit, 5 µg rakke ja 10 µg ekstratsellulaarseid vesiikuleid. Joonise vasakpoolsed tulbad, mis on tähistatud numbriga I, näitavad proove enne korduspuhastamist ja parempoolsed tulbad, mis on tähistatud numbriga II, proove pärast korduspuhastamist.

Eksosoomide detekteerimiseks kasutati TSG101 valgu vastast antikeha. TSG101 on kasvaja vastuvõtlikkuse geeni 101 (ingl. k *tumor susceptibility gene 101*) valk, mis reguleerib vesiikulite transpordiprotsessi (Uniprot). Käesolevas töös on anti-TSG101 antikeha kasutatud eksosoomide markerina, mille abil on tehtud kindlaks, kui efektiivne on transfekteeeritud rakkude korduspuhastamine ja kas eksosoomid jäävad proovidesse alles ka pärast teistkordset PBS-ga puhastamist ning tsentrifuugimist. Joonisel 3 on võrreldud proove enne ja pärast

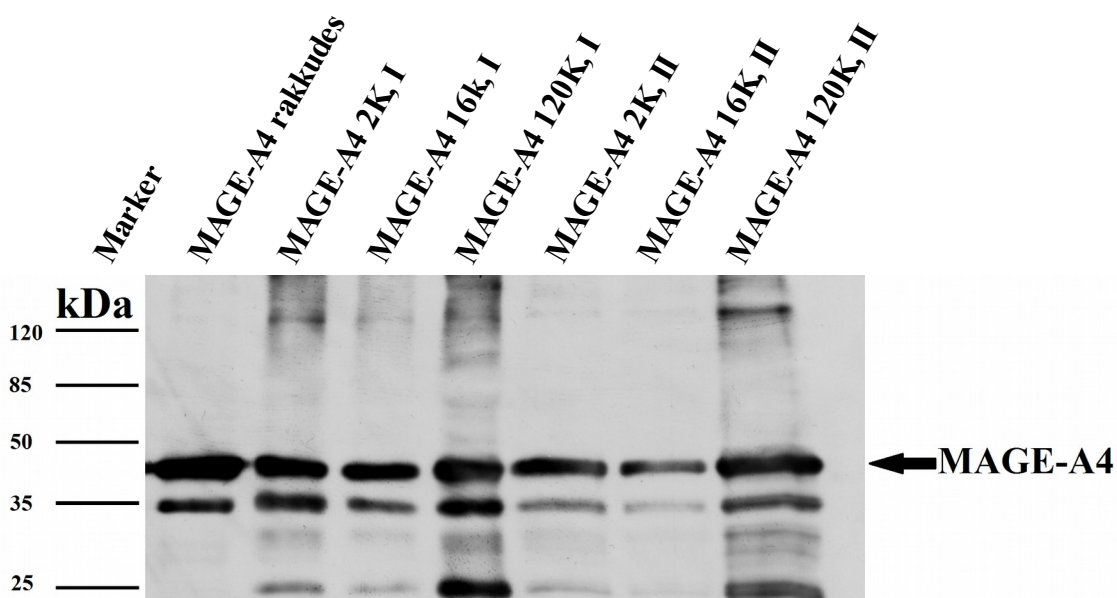
ekstratsellulaarsete vesiikulite korduspuhastamist ning sellelt võib näha, et PBS-ga puhastamise ja tsentrifuugimise järel on eksosoomid püsima jäänud.



*Joonis 3. Ekstratsellulaarsete vesiikulite Western blot analüüs transfecteeritud COP5EBNA rakuliinist antikehaga TSG101 enne ja pärast korduspuhastamist. Elektroforeesil kanti iga proovi geeli radadele 5 µg markerit, 5 µg rakke ja 10 µg ekstratsellulaarseid vesiikuleid. Western blot'is inkubeeriti proove primaarse antikehaga anti-TSG101 ja sekundaarse antikehaga GAR. Positiivne kontrollproov on plasmiidiga transfecteeritud rakud. TSG101 valgule vastavad bändid on tähistatud noolega. Joonise vasakpoolsed tulbad, mis on tähistatud numbriga I, näitavad proove enne korduspuhastamist ja parempoolsed tulbad, mis on tähistatud numbriga II, proove pärast korduspuhastamist.*

### 2.3.2 *MAGE-A* valkude ekspresseerumine ekstratsellulaarsetes vesiikulites

Käesolevas alapeatükis vaadeldakse, kas MAGE-A4 ja MAGE-A10 valgud ekspresseeruvad ekstratsellulaarsetes vesiikulites. Selleks on uuritavate valkudega korraldatud *Western blot*'i analüüs. Analüüsiks kasutati COP5EBNA rakke, mis olid transfecteeritud uuritavaid antigeene kodeerivate plasmiididega. Negatiivne kontroll teostati *carrier* DNA-ga (lõhe sperma DNA) transfecteeritud rakkudest eraldatud EV-dega ja positiivne kontroll plasmiidiga transfecteeritud COP5EBNA rakkudega.

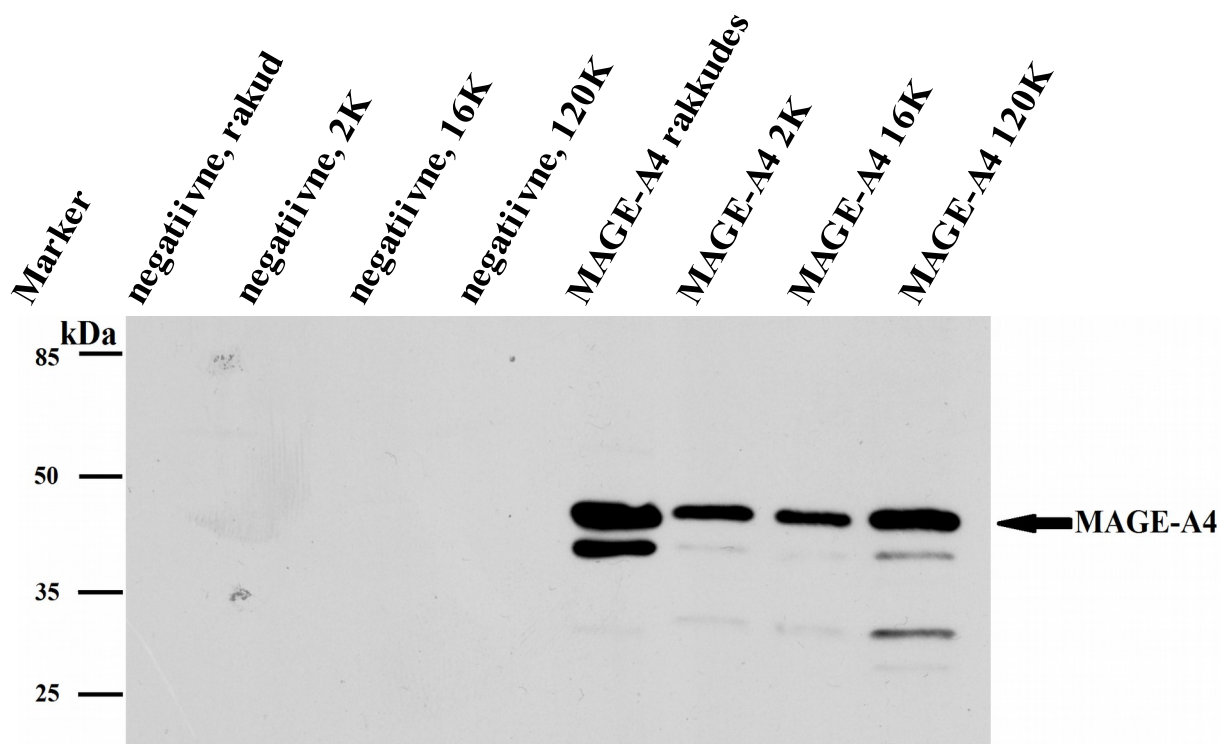


Joonis 4. *Western blot* analüüs transfecteeritud COP5EBNA rakuliinist MAGE-A4 spetsiifilise antikehaga enne ja pärast korduspuhastamist. Sööde tsentrifuugiti 48 tundi pärast transfectsiooni pQMCF-MAGE-A4 plasmiididega. COP5EBNA rakke pesti PBS-ga, suspendeeriti 5 minutit 4000 rpm, seejärel suspendeeriti eraldunud sade PBS-s. Elektroforeesil kanti iga proovi geeli radadele 5 µg markerit, 5 µg rakke ja 10 µg ekstratsellulaarseid vesiikuleid. *Western blot*'is inkubeeriti proove primaarse antikehaga anti-MAGE-A4 ja sekundaarse antikehaga GAR. Positiivne kontrollproov on plasmiidiga transfecteeritud rakud. MAGE-A4 valgule vastavad bändid on tähistatud noolega. Joonise vasakpoolsed tulbad, mis on tähistatud numbriga I, näitavad proove enne korduspuhastamist ja parempoolsed tulbad, mis on tähistatud numbriga II, proove pärast korduspuhastamist.

MAGE-A4 valgu detekteerimiseks kasutati MAGE-A4 spetsiifilist primaarset antikeha anti-MAGE-A4. Selle abil tehti kindlaks, et transfectsioonid olid edukad ja MAGE-A4 esines ekstratsellulaarsetes vesiikulites. MAGE-A4 olemasolu eri liiki vesiikulites ei erinenud kuigivõrd, aga teistest ekstratsellulaarsetest vesiikulitest veidi enam esines seda eksosoomides

(120K pellet). Positiivse kontrollina analüüsiti ka transfekteeeritud rakke. Selleks, et puhastada proovid liigsetest valkudest, tehti kordustsentrifuugimine. Joonisel 4 on võrreldud proove enne ja pärast ekstratsellulaarsete vesiikulite korduspuhastamist ning sellelt võib näha, et PBS-ga puhastamise ja tsentrifuugimise järel on ülejäänud valkude osakaal ekstratsellulaarsetes vesiikulites vähenenud, aga MAGE-A4 valk vesiikulitesse püsima jäänud.

MAGE-A4 lülitamise spetsiifilisuse kontrollimiseks tehtud *Western blot*'i analüüsist, kus on lisaks transfekteeeritud rakkudele kasutatud ka *carrier* DNA-d (lõhe sperma DNA-d) negatiivse kontrollina, selgus, et transfektsioonid olid edukad ja MAGE-A4 esines kõigis ekstratsellulaarsetes vesiikulites (joonis 5). MAGE-A4 ekspressioon sõltus ekstratsellulaarsete vesiikulite tüübist: kõige rohkem esines valku eksosoomides (120K pellet).

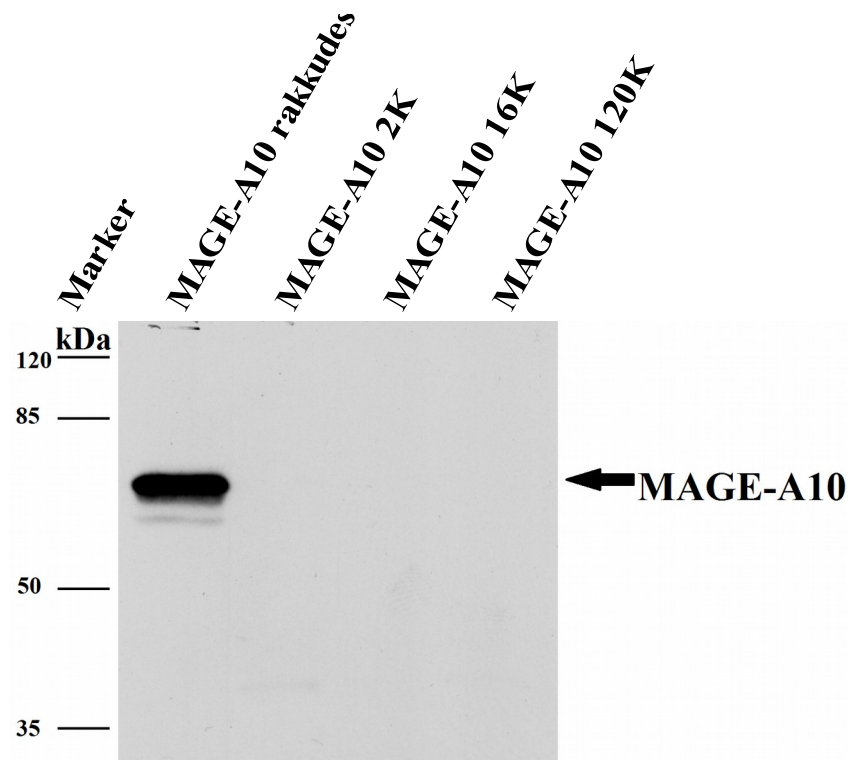


Joonis 5. *Western blot* analüüs transfekteeeritud COP5EBNA rakuliinist MAGE-A4 spetsiifilise antikehaga. Elektroforeesil kanti iga proovi geeli radadele 5 µg markerit, 5 µg rakke ja 10 µg ekstratsellulaarseid vesiikuleid. *Western blot*'is inkubeeriti proove primaarse antikehaga anti-MAGE-A4 ja sekundaarse antikehaga GAR. Positiivne kontrollproov on plasmiidiga transfekteeeritud rakud, negatiivne kontrollproov *carrier* DNA (lõhe sperma DNA). MAGE-A4 valgule vastavad bändid on tähistatud noolega.

Kasutades MAGE-A10 spetsiifilist primaarset antikeha anti-MAGE-A10, ei suudetud tuvastada MAGEA10 ekspressiooni ekstratsellulaarsetes vesiikulites *Western blot*'i analüüsil



(joonis 6). Plasmiid esines küll transfekteeeritud rakkudega tehtud positiivses kontrollproovis, aga puudus kõigist kolme tüüpi ekstratsellulaarsetest vesiikulitest.

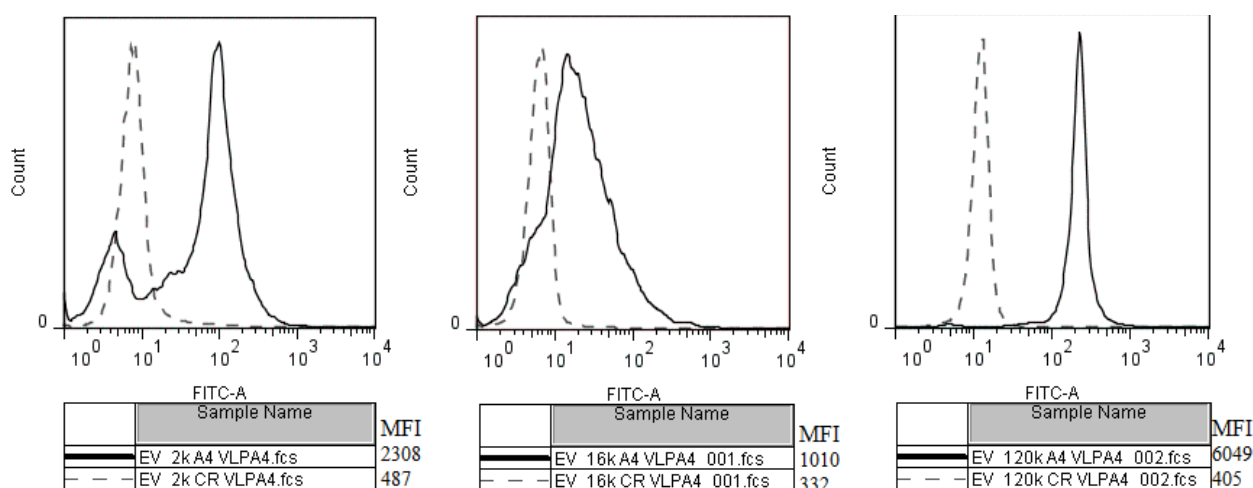


*Joonis 6. Western blot analüüs transfekteeeritud COP5EBNA rakuliinist MAGE-A10 spetsiifilise antikehaga. Elektroforeesil kanti iga proovi geeli radadele 5 µg markerit, 5 µg rakke ja 10 µg ekstratsellulaarseid vesiikuleid. Western blot'is inkubeeriti proove primaarse antikehaga anti-MAGE-A10 ja sekundaarse antikehaga GAR. Positiivne kontrollproov on plasmiidiga transfekteeeritud rakud. MAGE-A10 valgule vastavad bändid on tähistatud noolega.*

### 2.3.3 *MAGE-A* valkude ekspresseerumine ekstratsellulaarsete vesiikulite pinnal

Järgmiseks ülesandeks oli välja selgitada, kas MAGE-A4 ja MAGE-A10 valgud ekspresseeruvad ekstratsellulaarsete vesiikulite pinnal. Seda kontrolliti fluorestsents-aktiveeritud rakusorteerimise (FACS) abil. Kuna ekstratsellulaarsete vesiikulite partiklid on väga väikesed, pole neid eraldi võimalik FACS meetodiga otse vaadata, seetõttu seoti vesiikulid 4  $\mu$ m läbimõõduga latekskerakeste pinnale.

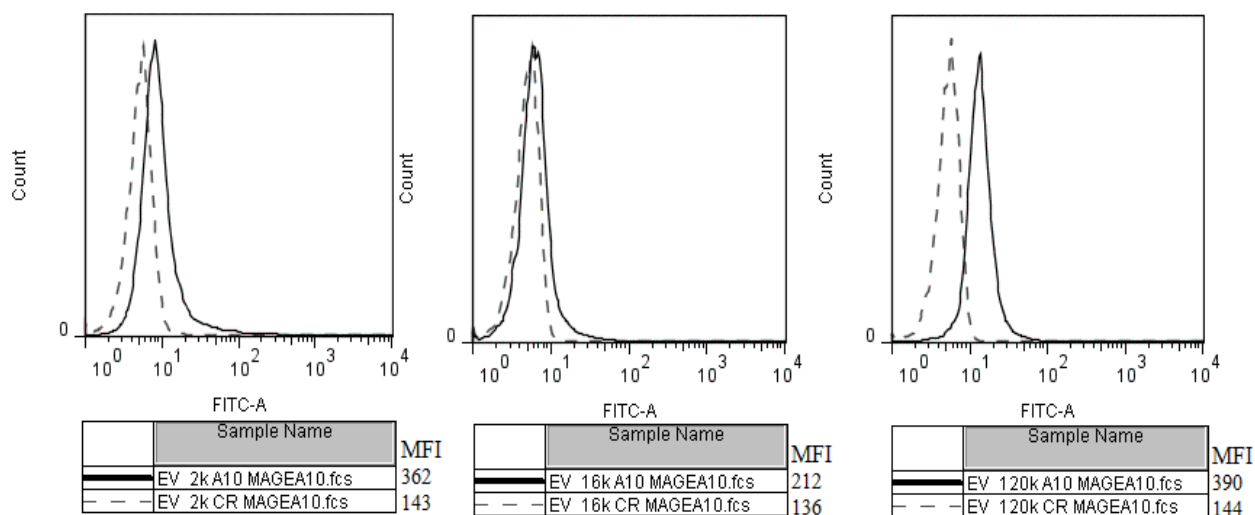
FACS analüüsid teostati COP5EBNA rakuliinist eraldatud ekstratsellulaarsete vesiikulitega, mis olid inkubeeritud aldehüüd/sulfaat latekskerakestega. Kerakestega ekstratsellulaarsed vesiikulid inkubeeriti MAGE-A4 ja MAGE-A10 vastaste primaarsete antikehadega ning Alexa488 fluorokroomi kandvate sekundaarsete antikehadega.



**Joonis 7. FACS analüüs MAGE-A4 kandvatest COP5EBNA rakuliinist eraldatud ekstratsellulaarsetest vesiikulitest.** Ekstratsellulaarsed vesiikulid on inkubeeritud latekskerakestega. Kerakestega vesiikulid on inkubeeritud primaarse antikehaga anti-MAGE-A4 ja sekundaarse antikehaga Alexa488. Negatiivne kontrollproov on *carrier* DNA (lõhe sperma DNA), mis sisaldab anti-MAGE-A4 antikeha. Katkendliku joonega on tähistatud negatiivne kontrollproov ja pideva joonega MAGE-A4 valku sisaldav proov. Vasakpoolsel joonisel on kujutatud MAGE-A4 sisaldust apoptootilistes kehakestes, keskmisel joonisel mikrovesiikulites ja parempoolsel joonisel eksosoomides. MFI tähistab peamist fluorestsentsi intensiivsust (ingl. k *mean fluorescence intensity*).

Vaadeldes MAGE-A4 valgu esinemist eri tüüpi ekstratsellulaarsete vesiikulite pinnal võib väita, et valgu ekspressioon sõltub vesiikuli tüübist (joonis 7). Kõige rohkem leidis MAGE-A4 eksosoomide pinnal (120K pellet), sellele järgnesid apoptootilised kehakesed (2K pellet). Kõige vähem ekspresseeriti MAGE-A4 valku mikrovesiikulite pinnal (16K pellet).

MAGE-A10 valku ekspresseeriti iga tüüpi ekstratsellulaarsete vesiikulite pinnal tunduvalt vähem kui MAGE-A4 valku (joonis 8). Kuigi *Western blot*'i analüüsi põhjal ei ekspresseeritud MAGE-A10 valku mitte ühtki tüüpi ekstratsellulaarsetes vesiikulites, esines seda vähesel määral eksosoomide pinnal (120K pellet). Apoptootiliste kehakeste (2K pellet) ja mikrovesiikulite pinnal (16K pellet) ei leidunud MAGE-A10 valku peaaegu üldse.



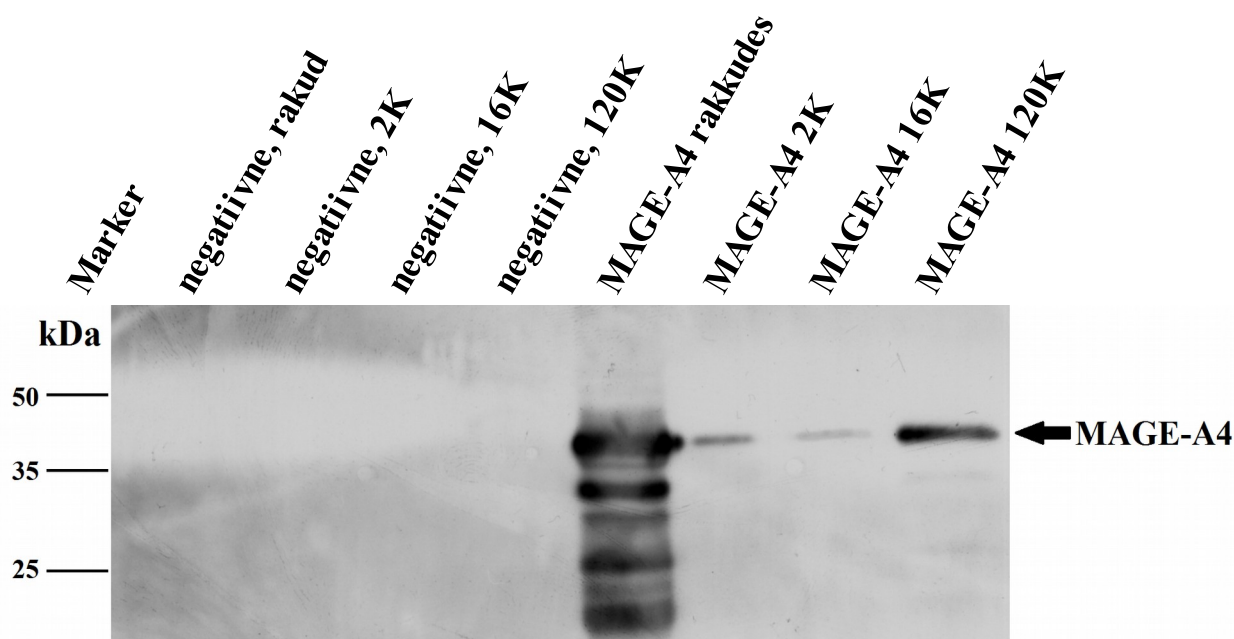
**Joonis 8. FACS analüüs MAGE-A10 kandvatest COP5EBNA rakuliini ekstratsellulaarsetest vesiikulitest.**

Ekstratsellulaarsed vesiikulid on inkubeeritud latekskerakestega. Kerakestega vesiikulid on inkubeeritud primaarse antikehaga anti-MAGE-A10 ja sekundaarse antikehaga Alexa488. Negatiivne kontrollproov on *carrier* DNA (lõhe sperma DNA), mis sisaldab anti-MAGE-A10 antikeha. Katkendliku joonega on tähistatud negatiivne kontrollproov ja pideva joonega MAGE-A10 valku sisaldav proov. Vasakpoolsel joonisel on kujutatud MAGE-A10 sisaldust apoptootilistes kehakestes, keskmisel joonisel mikrovesiikulites ja parempoolsel joonisel eksosoomides. MFI tähistab peamist fluorestsentsi intensiivsust (ingl. k *mean fluorescence intensity*).

### 2.3.4 *MAGE-A4 ja MAGE-A10 lülitumine ekstratsellulaarsetesse vesiikulitesse HEK293 ja U2OS rakkudes*

Selleks, et uurida, kuidas lülituvad MAGE-A4 ja MAGE-A10 valgud ekstratsellulaarsetesse vesiikulitesse ka teistes rakuliinides peale COP5EBNA, teostati analoogsed katsed inimese rakuliinides HEK293 (embrüonaalsed neerurakud) ja U2OS (luuvähi rakud). MAGE-A4 ja MAGE-A10 valkude esinemist ekstratsellulaarsete vesiikulites analüüsiti *Western blot*'i meetodiga ja eksponeerumist pinnal kontrolliti fluorestsents-aktiveeritud rakusorteerimise (FACS) abil.

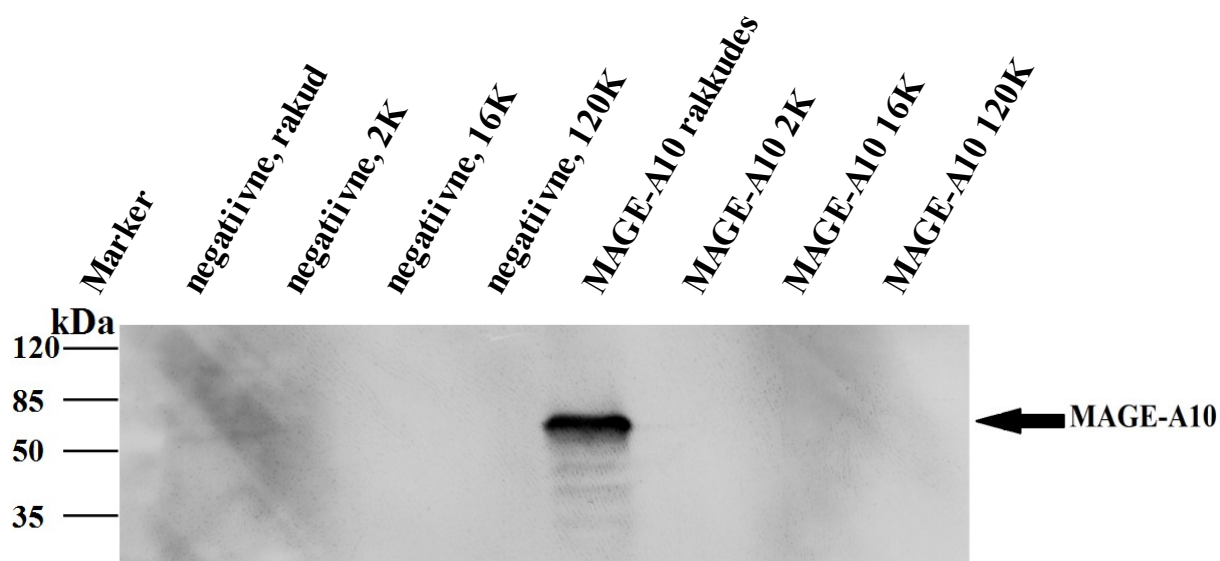
Kasutades MAGE-A4 spetsiifilist primaarset antikeha anti-MAGE-A4, tehti *Western blot*'i analüüsiga kindlaks, et HEK293 rakuliini puhul ekspresseerub MAGE-A4 valk ekstratsellulaarsetes vesiikulites. Joonisel 9 on näha, et peamiselt esineb MAGE-A4 valk eksosoomides (120K pellet). Tunduvalt vähem leidis seda apoptootilistes kehakestes (2K pellet) ja veel vähem mikrovesiikulites (16K pellet).



Joonis 9. *Western blot* analüüs transfecteeritud HEK293 rakuliinist MAGE-A4 spetsiifilise antikehaga. Elektroforeesil kanti iga proovi geeli radadele 5 µg markerit, 5 µg rakke ja 10 µg ekstratsellulaarseid vesiikuleid. *Western blot*'is inkubeeriti proove primaarse antikehaga anti-MAGE-A4 ja sekundaarse antikehaga GAR. Positiivne kontrollproov on plasmiidiga transfecteeritud rakud, negatiivne kontrollproov *carrier* DNA (lõhe sperma DNA). MAGE-A4 valgule vastavad bändid on tähistatud noolega.

Kasutades MAGE-A10 spetsiifilist primaarset antikeha anti-MAGE-A10, tehti *Western blot*'i analüüsiga kindlaks, et HEK293 rakuliini puhul ei ekspresseeru MAGE-A10 valk

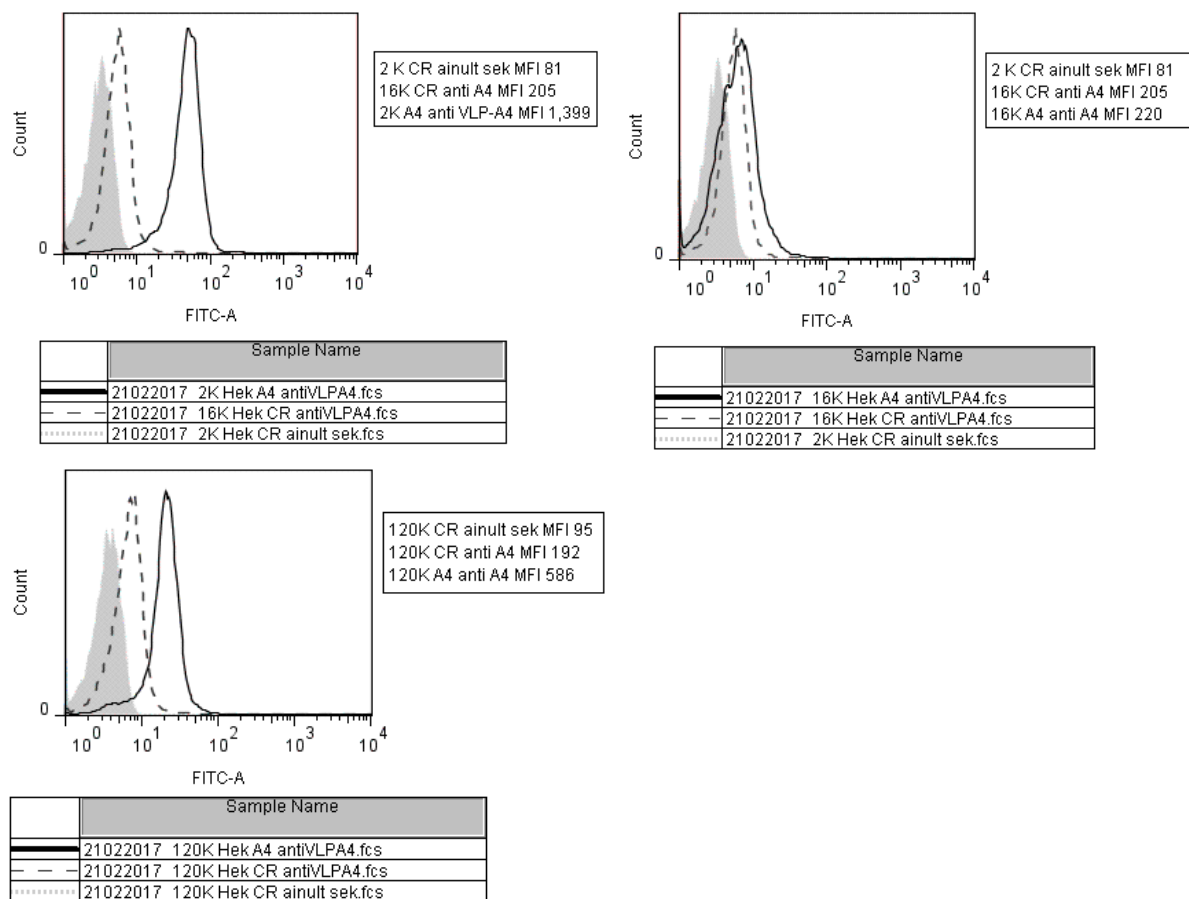
ekstratsellulaarsetes vesiikulites (joonis 10). MAGE-A10 valku leidis küll transfecteeritud rakkudega tehtud positiivses kontrollproovis, aga seda ei ekspresseeritud ekstratsellulaarsetes vesiikulites.



*Joonis 10. Western blot analüüs transfecteeritud HEK293 rakuliinist MAGE-A10 spetsiifilise antikehaga. Elektrofooresil kanti iga proovi geeli radadele 5 µg markerit, 5 µg rakke ja 10 µg ekstratsellulaarseid vesiikuleid. Western blot'is inkubeeriti proove primaarse antikehaga anti-MAGE-A10 ja sekundaarse antikehaga GAR. Positiivne kontrollproov on plasmiidiga transfecteeritud rakud, negatiivne kontrollproov carrier DNA (lõhe sperma DNA). MAGE-A10 valgule vastavad bändid on tähistatud noolega.*

Selleks, et uurida, kas MAGE-A4 ja MAGE-A10 valgud asuvad HEK293 rakuliini ekstratsellulaarsete vesiikulite pinnal, kasutati fluorestsents-aktiveeritud rakusorteerimist (FACS). FACS analüüsid teostati HEK293 rakuliini ekstratsellulaarsete vesiikulitega, mis olid inkubeeritud aldehüüd/sulfaat latekskerakestega. Kerakestega ekstratsellulaarsed vesiikulid inkubeeriti MAGE-A4 ja MAGE-A10 vastaste primaarsete antikehadega ning Alexa488 fluorokroomi kandvate sekundaarsete antikehadega.

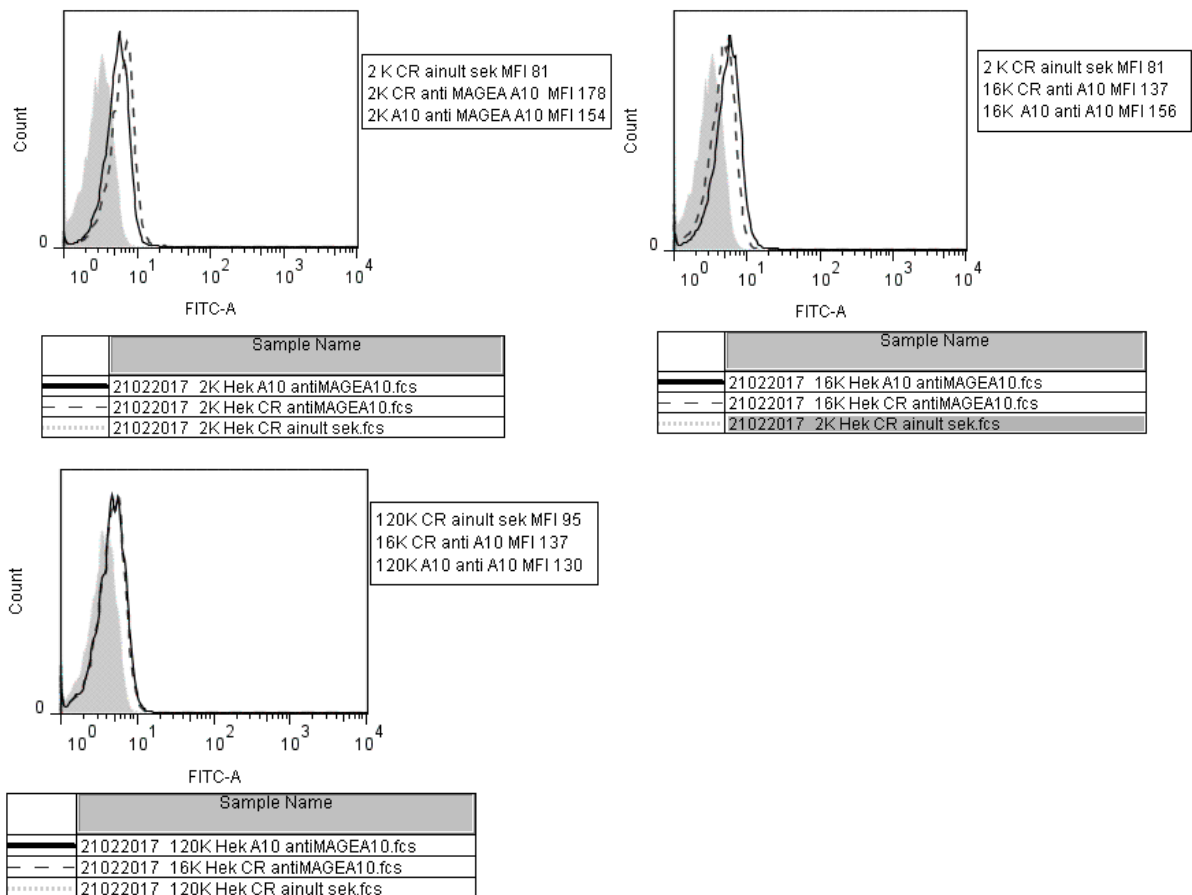
Kui uurida MAGE-A4 valgu esinemist eri tüüpi ekstratsellulaarsete vesiikulite pinnal, võib märgata, et valgu ekspressioon erineb vastavalt vesiikuli tüübile (joonis 11). Kõige rohkem ekspresseeriti MAGE-A4 apoptootiliste kehakeste pinnal (2K pellet), seejärel eksosoomide pinnal (120K pellet). Tunduvalt vähem leidis MAGE-A4 valku mikrovesiikulite pinnal (16K pellet).



**Joonis 11. FACS analüüs MAGE-A4 kandvatest HEK293 rakuliini ekstratsellulaarsetest vesiikulitest.**

Ekstratsellulaarsed vesiikulid on inkubeeritud latekskerakestega. Kerakestega vesiikulid on inkubeeritud primaarse antikehaga anti-MAGE-A4 ja sekundaarse antikehaga Alexa488. Negatiivne kontrollproov on *carrier* DNA (lõhe sperma DNA), mis sisaldab anti-MAGE-A4 antikeha. Katkendliku joonega on tähistatud negatiivne kontrollproov ja pideva joonega MAGE-A4 valku sisaldav proov. Hall ala näitab sekundaarse antikehaga Alexa488 saadud signaali. Vasakpoolsel joonisel on kujutatud MAGE-A4 sisaldust apoptootilistes kehakestes, parempoolsel joonisel mikrovesiikulites ja alumisel joonisel eksosoomides. MFI tähistab peamist fluorestsentsi intensiivsust (ingl. k *mean fluorescence intensity*).

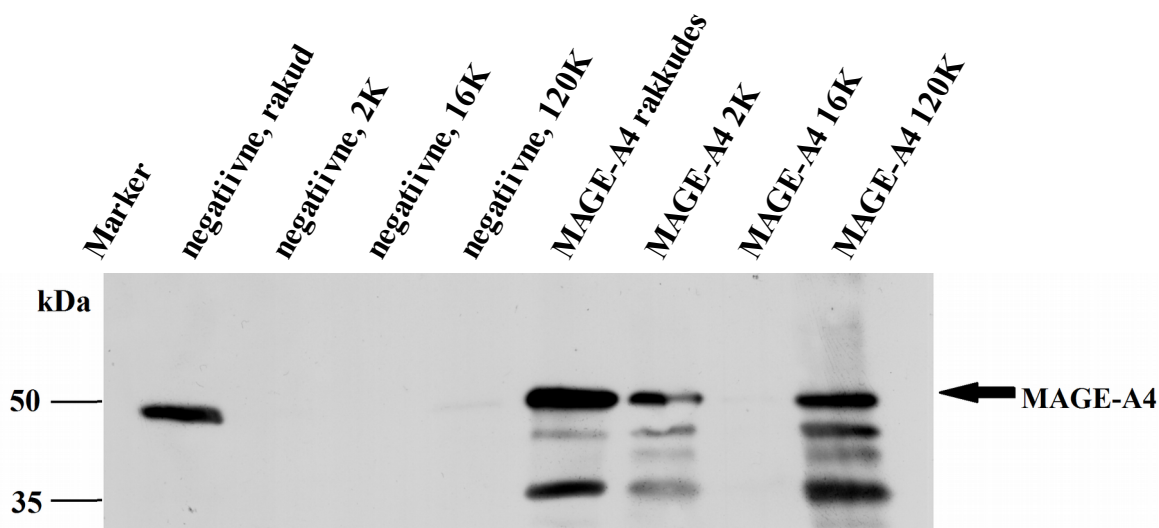
MAGE-A10 valguga ekspressiooni HEK293 rakkudest eraldatud ekstratsellulaarsete vesiikulite pinnal tuvastada ei õnnestunud (joonis 12).



#### Joonis 12. FACS analüüs MAGE-A10 kandvatest HEK293 rakuliini ekstratsellulaarsetest vesiikulitest.

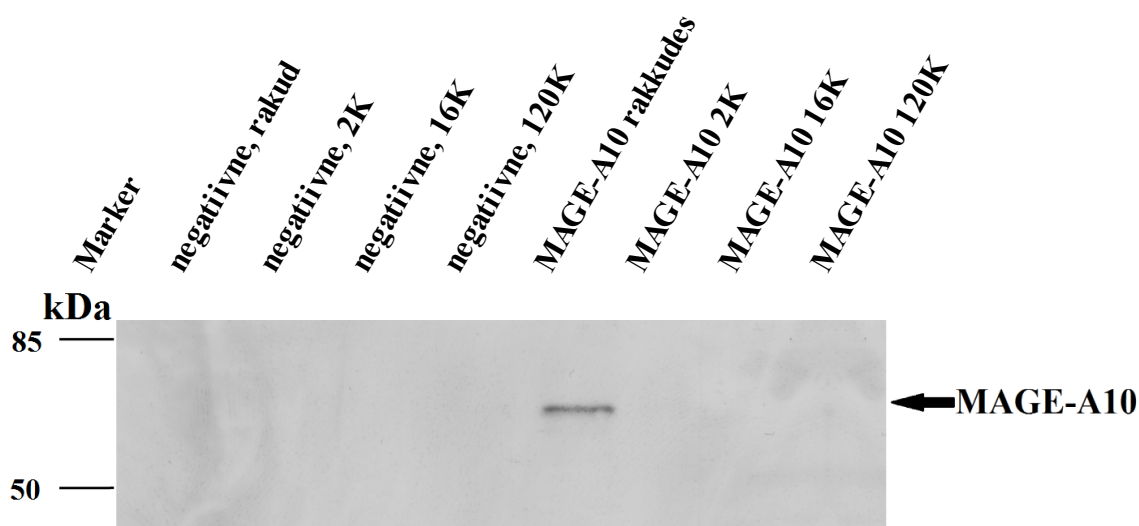
Ekstratsellulaarsed vesiikulid on inkubeeritud latekskerakestega. Kerakestega vesiikulid on inkubeeritud primaarse antikehaga anti-MAGE-A10 ja sekundaarse antikehaga Alexa488. Negatiivne kontrollproov on *carrier* DNA (lõhe sperma DNA), mis sisaldab anti-MAGE-A10 antikeha. Katkendliku joonega on tähistatud negatiivne kontrollproov ja pideva joonega MAGE-A10 valku sisaldav proov. Hall ala näitab sekundaarse antikehaga Alexa488 saadud signaali. Vasakpoolsel joonisel on kujutatud MAGE-A10 sisaldust apoptootilistes kehakestes, parempoolsel joonisel mikrovesiikulites ja alumisel joonisel eksosoomides. MFI tähistab peamist fluorestsentsi intensiivsust (ingl. *k mean fluorescence intensity*).

Selleks, et uurida, kas MAGE-A4 valk ekspresseerub ekstratsellulaarsetes vesiikulites U2OS rakuliini puhul, kasutati MAGE-A4 spetsiifilist primaarset antikeha anti-MAGE-A4. Tehti kindlaks, et MAGE-A4 ekspresseerub ekstratsellulaarsetes vesiikulites. Joonisel 13 selgub, et peamiselt leidub MAGE-A4 valku eksosoomides (120K pellet), veidi vähem apoptootilistes kehakestes (2K pellet). Mikrovesiikulites (16K pellet) MAGE-A4 ei esinenud. Kuna U2OS rakud ekspresseerivad ise MAGE-A4 valku, leidub seda ka *carrier* DNA rakkudega tehtud negatiivses kontrollanalüüsis ja see on vähesel määral detekteeritav ka *carrier*'iga poreeritud 120K pelleti proovis.



Joonis 13. *Western blot* analüüs transfecteeritud U2OS rakuliinist MAGE-A4 spetsiifilise antikehaga. Elektroforeesil kanti iga proovi geeli radadele 5 µg markerit, 5 µg rakke ja 10 µg ekstratsellulaarseid vesiikuleid. *Western blot*'is inkubeeriti proove primaarse antikehaga anti-MAGE-A4 ja sekundaarse antikehaga GAR. Positiivne kontrollproov on plasmiidiga transfecteeritud rakud, negatiivne kontrollproov *carrier* DNA (lõhe sperma DNA). MAGE-A4 valgule vastavad bändid on tähistatud noolega.

MAGE-A10 valgu ekspressiooni uurimiseks U2OS rakuliinis kasutati MAGE-A10 spetsiifilist primaarset antikeha anti-MAGE-A10. Selgus, et MAGE-A10 valk ei ekspresseeru ekstratsellulaarsetes vesiikulites. Joonisel 14 on näha, et MAGE-A10 valk on olemas transfecteeritud U2OS rakkudega tehtud positiivses kontrollanalüüsis, aga seda ei ekspresseerita mitte üheski ekstratsellulaarsete vesiikulite tüübis.



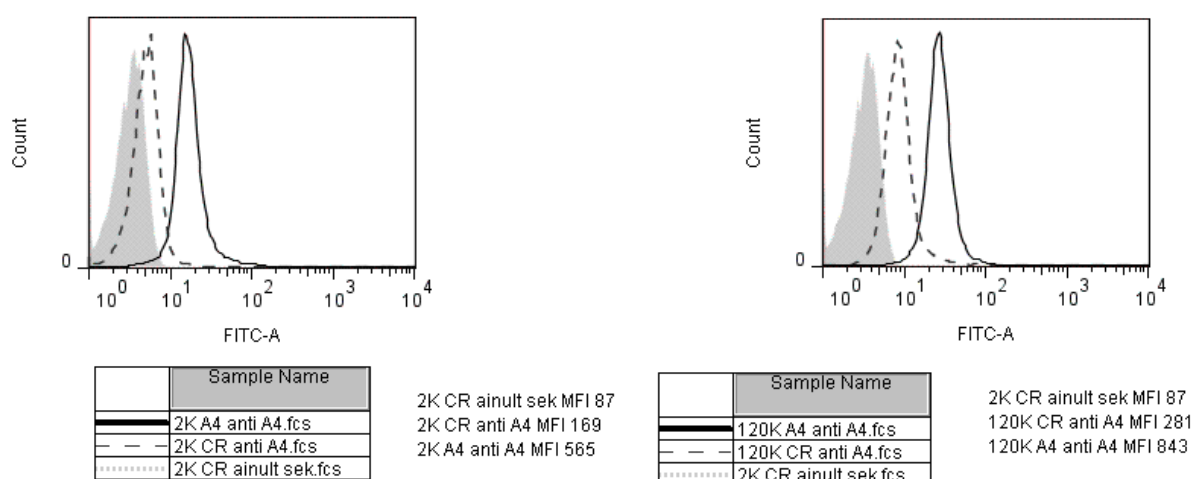
Joonis 14. *Western blot* analüüs transfecteeritud U2OS rakuliinist MAGE-A10 spetsiifilise antikehaga. Elektroforeesil kanti iga proovi geeli radadele 5 µg markerit, 5 µg rakke ja 10 µg ekstratsellulaarseid vesiikuleid. *Western blot*'is inkubeeriti proove primaarse antikehaga anti-MAGE-A10 ja sekundaarse antikehaga GAR.



Positiivne kontrollproov on plasmiidiga transfecteeritud rakud, negatiivne kontrollproov *carrier* DNA (lõhe sperma DNA). MAGE-A10 valgule vastavad bändid on tähistatud noolega.

MAGE-A4 ja MAGE-A10 valkude ekspresseerumist U2OS rakuliini ekstratsellulaarsete vesiikulite pinnal vaadeldi fluorestsents-aktiveeritud rakusorteerimise (FACS) abil. FACS analüüsid teostati U2OS rakuliini ekstratsellulaarsete vesiikulitega, mis olid inkubeeritud aldehüüd/sulfaat latekskerakestega. Kerakestega ekstratsellulaarsed vesiikulid inkubeeriti MAGE-A4 ja MAGE-A10 vastaste primaarsete antikehadega ning Alexa488 fluorokroomi kandvate sekundaarsete antikehadega.

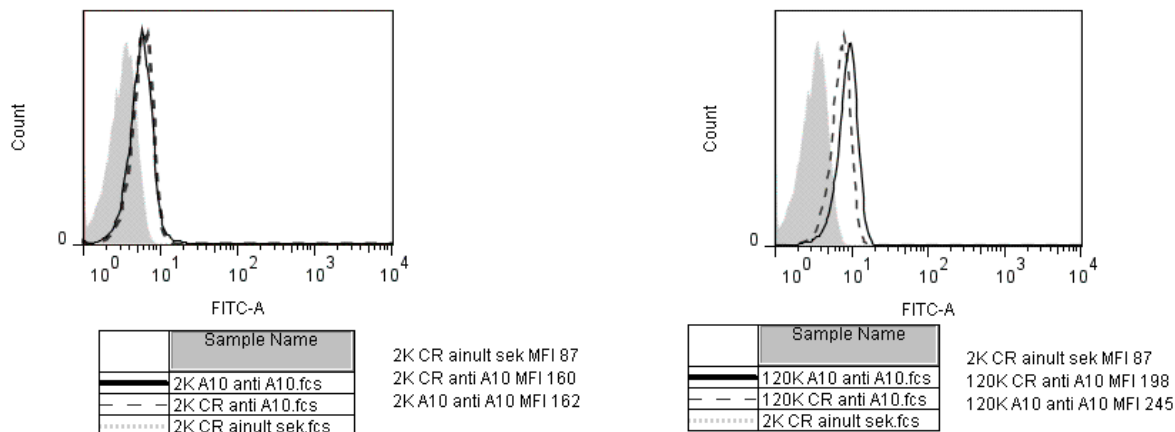
MAGE-A4 valgu esinemine eri tüüpi ekstratsellulaarsete vesiikulite pinnal sõltus vesiikuli tüübist (joonis 15). Apoptootiliste kehakeste (2K pellet) ja eksosoomide (120K pellet) pinnal leidis seda peaaegu sama palju.



**Joonis 15. FACS analüüs MAGE-A4 kandvatest U2OS rakuliini ekstratsellulaarsetest vesiikutest.** Ekstratsellulaarsed vesiikulid on inkubeeritud latekskerakestega. Kerakestega vesiikulid on inkubeeritud primaarse antikehaga anti-MAGE-A4 ja sekundaarse antikehaga Alexa488. Negatiivne kontrollproov on *carrier* DNA (lõhe sperma DNA), mis sisaldab anti-MAGE-A4 antikeha. Katkendliku joonega on tähistatud negatiivne kontrollproov ja pideva joonega MAGE-A4 valku sisaldav proov. Hall ala näitab sekundaarse antikehaga Alexa488 saadud signaali. Vasakpoolsel joonisel on kujutatud MAGE-A4 sisaldust apoptootilistes kehakestes, parempoolsel joonisel eksosoomides. MFI tähistab peamist fluorestsentsi intensiivsust (ingl. k *mean fluorescence intensity*).

MAGE-A10 valku ekspresseeriti iga tüüpi ekstratsellulaarsete vesiikulite pinnal palju vähem kui MAGE-A4 valku (joonis 16). *Western blot*'i analüüsist selgus, et MAGE-A10 ei

ekspresseeru ühtki tüüpi ekstratsellulaarsetes vesiikulites, aga vesiikulite pinda uurides võis märgata, et väga vähe esines MAGE-A10 apoptootiliste kehakeste (2K pellet) ja eksosoomide (120K pellet) pinnal.

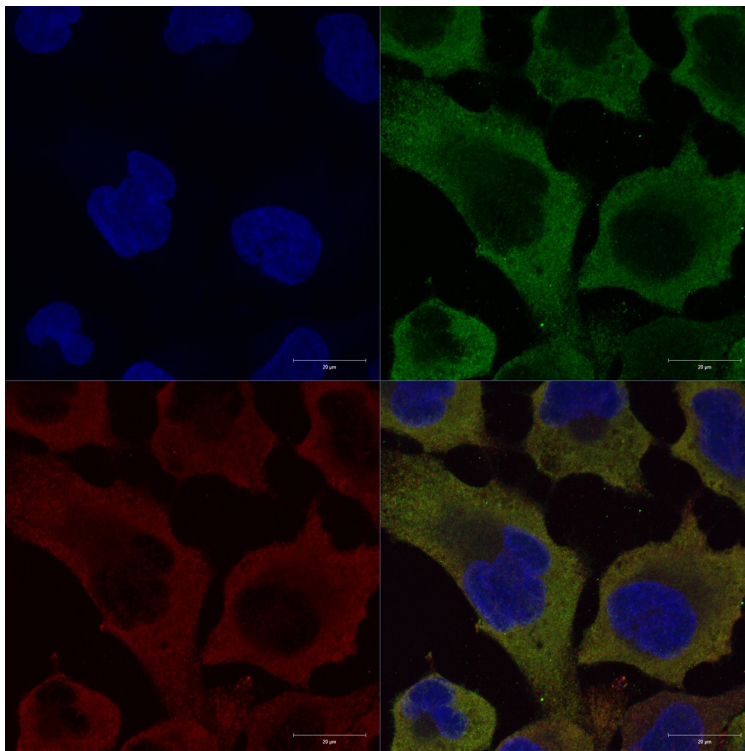


**Joonis 16. FACS analüüs MAGE-A10 kandvatest U2OS rakuliini ekstratsellulaarsetest vesiikulitest.**

Ekstratsellulaarsed vesiikulid on inkubeeritud latekskerakestega. Kerakestega vesiikulid on inkubeeritud primaarse antikehaga anti-MAGE-A10 ja sekundaarse antikehaga Alexa488. Negatiivne kontrollproov on *carrier* DNA (lõhe sperma DNA), mis sisaldab anti-MAGE-A10 antikeha. Katkendliku joonega on tähistatud negatiivne kontrollproov ja pideva joonega MAGE-A10 valku sisaldav proov. Hall ala näitab sekundaarse antikehaga Alexa488 saadud signaali. Vasakpoolisel joonisel on kujutatud MAGE-A10 sisaldust apoptootilistes kehakestes, parempoolisel joonisel eksosoomides. MFI tähistab peamist fluorestsentsi intensiivsust (ingl. *k mean fluorescence intensity*).

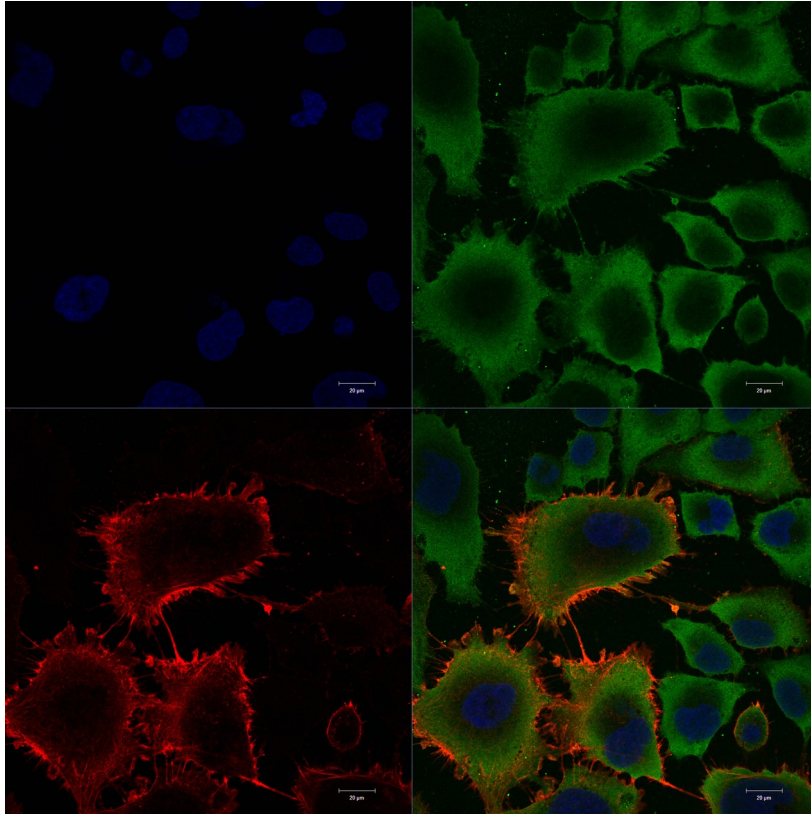
### ***2.3.5 MAGE-A4 valgu ekspresseerumine U2OS rakkudes – immunofluorestsentsanalüüs***

Käesoleva alapeatüki eesmärgiks on kirjeldada MAGE-A4 valgu ekspresseerumist inimese luuvähi rakkudes U2OS. Selleks, et uurida, millistes raku osades MAGE-A4 esineb, teostati immunofluorestsentsanalüüs. MAGE-A4 tuvastamiseks kasutati primaarsete antikehadena MAGE-A4 spetsiifilisi antikehi anti-MAGE-A4, mis seoti sekundaarse antikehaga anti-rabbit-Alexa488. Raku eri osade esiletõstmiseks kasutati vastavate rakuorganite spetsiifilisi primaarseid antikehi: anti-RPS6, mis on ribosoomi valku detekteeriv antikeha (tabel 1, ptk 2.2.3); anti-beeta-aktiin, mis on tsütoskeleti mikrofilamentide ehk aktiinifilamentide antikeha (tabel 1, ptk 2.2.3); anti-alfa-tubuliin, mis on tsütoskeleti mikrotuubulite antikeha (tabel 1, ptk 2.2.3); anti-C1QBP1, mis on mitokondrite paikneva valgu antikeha (tabel 1, ptk 2.2.3); anti-fibronektiin, mis seondub ekstratsellulaarses maatriksis olevatele fibronektiinidele (tabel 1, ptk 2.2.3). Need seoti sekundaarse antikehaga anti-mouse-Alexa568. Kuna U2OS rakuliini rakud toodavad ise MAGE-A4 valku, ei ole uuritavaid rakke vastava valgu plasmiididega elektroporeeritud.



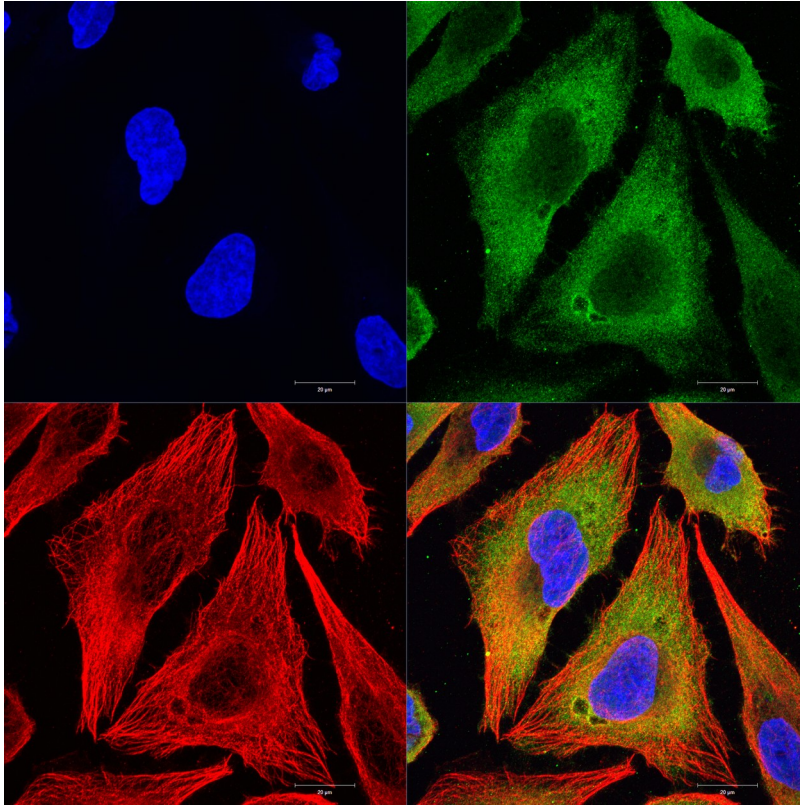
**Joonis 17. MAGE-A4 valgu ekspresseerumine U2OS rakkudes.** Rakke inkubeeriti anti-MAGE-A4 (roheline) ja anti-RPS6 (punane) antikehadega. Rakutuumad värviti DAPI-ga.

Joonisel 17 on vaadeldud MAGE-A4 valgu ja ribosoomi valgu RPS6 lokalisatsiooni rakus. Võib märgata, et MAGE-A4 esineb võrdlemisi ühtlaselt raku tsütoplasmas, enamasti konkreetseid piirkondi eelistamata. Joonisel ei ole aga näha MAGE-A4 ja ribosoomi valgu RPS6 kolokalisatsiooni, mis tähendab, et MAGE-A4 valku ei ekspresseerita ribosoomides.



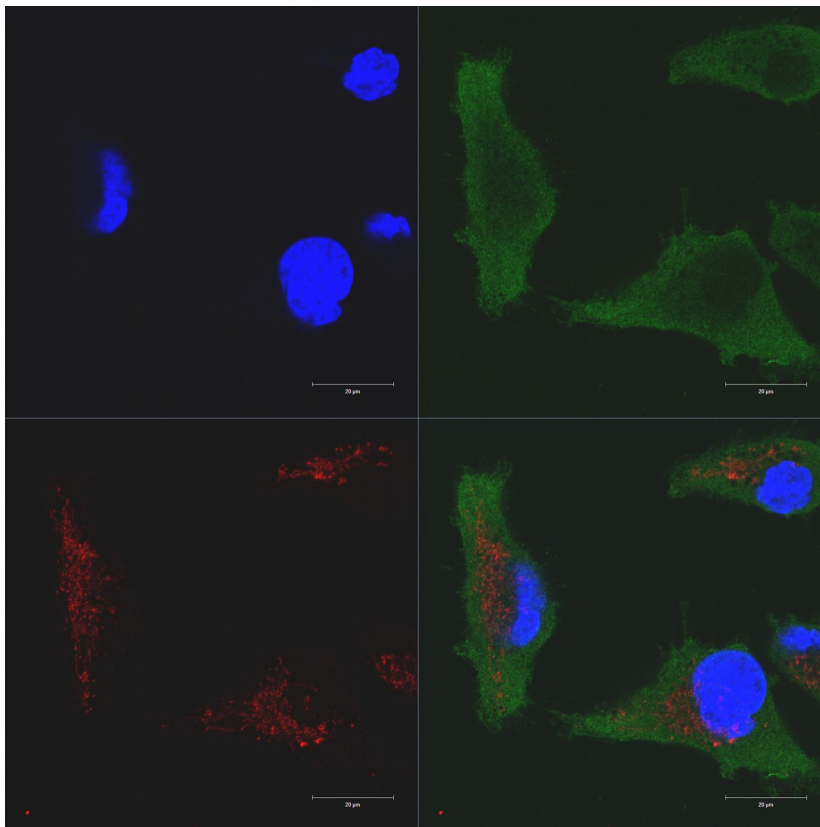
*Joonis 18. MAGE-A4 valgu ekspresseerumine U2OS rakkudes.* Rakke inkubeeriti anti-MAGE-A4 (roheline) ja anti-beeta-aktiini (punane) antikehadega. Rakutuumad värviti DAPI-ga.

Joonisel 18 on uuritud MAGE-A4 valgu ekspresseerumine uuritavate rakkude tsütoskeleti mikrofilamentides. MAGE-A4 ekspresseerub tsütoplasmas, kusjuures plasmamembraani läheduses leidub MAGE-A4 valku rohkem kui tuuma juures. Konfokaalmikroskoobipilt ei näita aga MAGE-A4 spetsiifilise antikeha ja mikrofilamentide spetsiifilise antikeha kolokalisatsiooni, mis tähendab, et MAGE-A4 valk ei ekspresseeru mikrofilamentides.



*Joonis 19. MAGE-A4 valgu ekspresseerumine U2OS rakkudes. Rakke inkubeeriti anti-MAGE-A4 (roheline) ja anti-alfa-tubuliini (punane) antikehadega. Rakutuumad värviti DAPI-ga.*

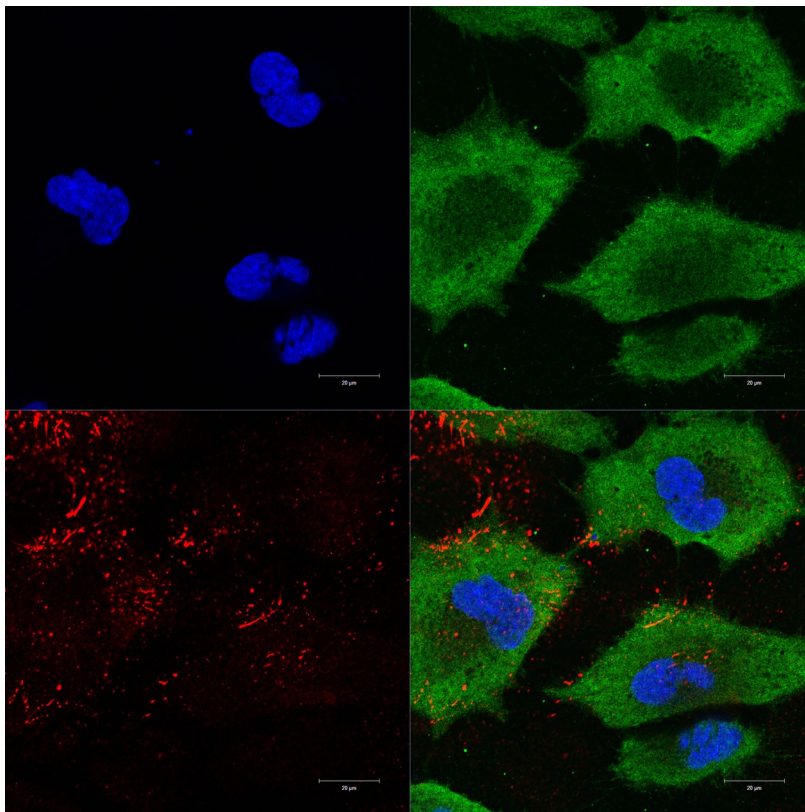
Joonisel 19 kujutatakse MAGE-A4 valkude ekspresseerumist uuritavate rakkude tsütoskeleti mikrotuubulites. MAGE-A4 esineb ühtlaselt tsütoplasmas üle kogu raku, aga joonisel ei ole näha MAGE-A4 ja mikrotuubulite valgu anti-alfa-tubuliini kolokalisatsiooni. See tähendab, et MAGE-A4 ei ekspresseerita tsütoskeleti mikrotuubulites.



*Joonis 20. MAGE-A4 valgu ekspresseerumine U2OS rakkudes. Rakke inkubeeriti anti-MAGE-A4 (roheline) ja anti-C1QBP1 (punane) antikehadega.*

Joonisel 20 on MAGE-A4 valgu ekspresseerumine uuritavate rakkude mitokondrites. Jooniselt on näha, et MAGE-A4 ekspresseerub ühtlaselt tsütoplasmas, aga ei ole märgata MAGE-A4 ja mitokondrivalgu C1QBP1 kolokalisatsiooni. Selline tulemus lubab väita, et MAGE-A4 valku ei ekspresseerita mitokondrites.





*Joonis 21. MAGE-A4 valgu ekspresseerumine U2OS rakkudes. Rakke inkubeeriti anti-MAGE-A4 (roheline) ja anti-fibronektiin (punane) antikehadega.*

Joonisel 21 on MAGE-A4 valgu ja fibronektiini kolokalisatsiooni vaatlus. Fibronektiinid on glükoproteiinid, mis on osa rakkudevahelisest maatriksist. Pilt näitab, et MAGE-A4 valku leidub ühtlaselt kogu tsütoplasmas, aga fibronektiinispetsiifilise antikeha ja MAGE-A4 spetsiifilise antikeha kolokalisatsiooni ei ole. Seega ei ekspresseerita MAGE-A4 valku fibronektiinides.

## 2.4 Arutelu

Käesolevas magistritöös on uuritud melanoomi antigeene MAGE-A4 ja MAGE-A10, pöörates eriti tähelepanu nende ekspresseerumisele ekstratsellulaarsetes vesiikulites. MAGE-A4 valku ekspresseeritakse peamiselt lamerakulises kartsinoomis, tunduvalt harvem adeokartsinoomis, ning MAGE-A10 valku kõige rohkem kopsu-, naha ja uroteliaalse vähi rakkudes, aga teatud määral ekspresseeruvad mõlemad valgud mitmes vähiliigis. Nad on kõrge immunogeensusega – eriti MAGE-A10 –, olles seega vähivastaste vaktsiinide ja immunoteraapia potentsiaalsed sihtmärgid. Kahest antigeenist on rohkem uuritud MAGE-A4 kasutusvõimalusi ja oletatud, et MAGE-A4 võib tulevikus aidata kaasa rinnavähi, lamerakk-kartsinoomi ning hepatotsellulaarse kartsinoomi ja selle varjatud hematogeensete metastaaside avastamisele.

Varasematest uurimustest on teada, et MAGE-A4 ja MAGE-A10 valke ekspresseeritakse rakkudes, aga veel ei ole tähelepanu alla võetud nende antigeenide võimalikku esinemist ekstratsellulaarsetes vesiikulites. Ekstratsellulaarsed vesiikulid on membraaniga ümbritsetud partiklid, mida rakud vabastavad rakuvälisesse mikrokeskkonda, ning nad täidavad olulist osa valkude, nukleiinhapete ja teiste biomolekulide transpordis rakkude ja kudede vahel. Ekstratsellulaarsed vesiikulid on suurepärased rakkudevahelise kommunikatsiooni vahendid, sest nad on võimelised minema mööda immuunaktivatsioonist ja püsima keerukates füsioloogilistes tingimustes üsna stabiilsena. Kuna ekstratsellulaarsed vesiikulid osalevad ka kommunikatsioonis bakterirakkude vahel ja kannavad ühest rakust teise resistentsusgene või virulentsusfaktoreid, on võimalik, et nad aitavad kaasa vähi levikule organismis, kandes vähi antigeene ühest rakust teise.

Selleks, et teha kindlaks, kas MAGE-A4 ja MAGE-A10 antigeenid võivad organismis levida ekstratsellulaarsete vesiikulite abil, on käesolevas uurimistöös vaadeldud, kas ja kuidas vastavad antigeenid eri tüüpi ekstratsellulaarsetes vesiikulites avalduvad. Töös on kasutatud rakuliine COP5EBNA, HEK293 ja U2OS ning plasmiide pQM-MAGE-A4 ja pQM-MAGE-A10.

*Western blot*'i analüüsid plasmiididega transfekteeritud rakkude ja ekstratsellulaarsete vesiikulite proovidest näitasid, et uuritavatest antigeenidest avaldub ekstratsellulaarsetes vesiikulites ainult MAGE-A4, mida ekspresseeritakse raku tsütoplasmas. Ekstratsellulaarsetest vesiikulitest leidis seda kõige rohkem eksosoomides, veidi vähem mikrovesiikulites ja apoptootilistes kehakestes. MAGE-A10, mis on rakutuuma valk, ei



ekspresseerunud ekstratsellulaarsetes vesiikulites. Võimalik on, et kahe valgu ekspressiooniprofiili erinevus sõltub nende asukohast rakus. MAGE-A4 valku ekspresseeritakse võrdlemisi ühtlaselt kogu tsütoplasmas, veidi rohkem plasmamembraani läheduses, MAGE-A10 ekspressioon on aga piiratud peamiselt rakutuumaga ja tsütoplasmas leidub seda väga vähe. Kuna ekstratsellulaarsed vesiikulid tekivad rakus kas endosoomi membraani või plasmamembraani pungumisel, haaravad nad MAGE-A4 valku endaga kaasa palju suurema tõenäosusega kui MAGE-A10 valku. Eksosoomides võib MAGE-A4 valku olla teistest ekstratsellulaarsetest vesiikulitest rohkem sellepärast, et teised vesiikulid tekivad raku plasmamembraani väljapoole pungumisel ja lõhustumisel, aga eksosoomid endosoomi membraani sissepoole pungumisel. Enne rakkudevahelisse keskkonda vabastamist asuvad nad mõnda aega raku sees, multivesikulaarsetes kehades, ja nende kokkupuude MAGE-A4 valguga on seetõttu pikem kui ülejäänud ekstratsellulaarsetel vesiikulitel.

Fluorestsents-aktiveeritud rakusorteerimise (FACS) abil kontrolliti, kas MAGE-A4 ja MAGE-A10 valgud ekspresseeruvad ekstratsellulaarsete vesiikulite pinnal. MAGE-A4 leidis taas kõige rohkem eksosoomide pinnal. Eksosoomidega peaaegu võrdselt esines MAGE-A4 valku apoptootiliste kehakeste pinnal ja tunduvalt vähem mikrovesiikulites. Kõige rohkem ekspresseerus MAGE-A4 COP5EBNA rakuliini ekstratsellulaarsete vesiikulite pinnal, palju vähem HEK293 ja U2OS rakuliinide ekstratsellulaarsete vesiikulite pinnal.

Hoolimata sellest, et MAGE-A10 vesiikulites ei ekspresseerunud, esines teda vähesel määral vesiikulite pinnal, aga palju vähem kui MAGE-A4 valku. COP5EBNA rakuliini vesiikulitest leidis MAGE-A10 valku pisut eksosoomide ja apoptootiliste kehakeste pinnal ning peaaegu üldse mitte mikrovesiikulite pinnal. HEK293 rakuliini vesiikulitest ekspresseerus MAGE-A10 väga vähesel määral apoptootiliste kehakeste ja mikrovesiikulite pinnal ning peaaegu üldse mitte eksosoomide pinnal. U2OS rakuliini vesiikulitest leidis MAGE-A10 valku väga vähe apoptootiliste kehakeste ja eksosoomide pinnal.

Ei varasemate uurimuste ega käesoleva töö andmete põhjal pole võimalik selgitada, missugused tegurid teevad võimalikuks MAGE-A4 ja MAGE-A10 valkude ekspresseerumise ekstratsellulaarsete vesiikulite pinnal. Seega jääb vastavate antigeenide esinemine ekstratsellulaarsete vesiikulite pinnal potentsiaalseks edasiseks uurimisvaldkonnaks.

Selleks, et uurida, kas MAGE-A4 valk ekspresseerub peale raku tsütoplasma veel mõnes rakuorganismis, teostati immunofluorestsentsanalüüs. Lähemalt vaadeldi MAGE-A4 esinemist ribosoomides, tsütoskeleti mikrofilamentides ja mikrotuubulites, mitokondrites ning

fibronektiinides. Analüüsiks valiti U2OS rakuliin, kuna need rakud toodavad ise MAGE-A4 valku ja seega pole rakke vaja eelnevalt vastava plasmiidiga elektroporeerida. Elektronmikroskoobi piltidelt ei tuvastatud MAGE-A4 spetsiifilise antikeha ega ühegi uuritud rakuorgani spetsiifilise antikeha kolokalisatsiooni. Järelikult ekspresseeritakse MAGE-A4 valku küll rakkude tsütoplasmas, aga mitte üheski teises rakuorganis, mida töö käigus vaadeldi.

## Kokkuvõte

Käesoleva uurimistöö eksperimentaalsest osast selgus, et MAGE-A4 ja MAGE-A10 valkude ekspressiooniprofiil ekstratsellulaarsetes vesiikulites on üsna erinev. Eukarüootseid COP5EBNA, HEK293 ja U2OS rakke transfecteeriti plasmiididega pQM-MAGE-A4 ja pQM-MAGE-A10 ning leiti, et kui MAGE-A4 valk ekspresseerus kõigis kolmes vesiikulitüübis (eksosoomid, mikrovesiikulid, apoptootilised kehakesed), siis MAGE-A10 valku ekstratsellulaarsetes vesiikulites ei esinenud. Põhjus võib peituda asjaolus, et MAGE-A4 on tsütoplasma valk, mis liitub rakust eralduvate ekstratsellulaarsete vesiikulite koostisesse, aga MAGE-A10 on tuumavalk, mis ei puutu rakus tekkivate ekstratsellulaarsete vesiikulitega piisavalt kokku, et nende koostises esineda.

Kõigis uuritud rakuliinides leidis MAGE-A4 valku kõige rohkem eksosoomides. Veidi vähem ekspresseerus MAGE-A4 apoptootilistes kehakestes ja kõige vähem oli seda mikrovesiikulites.

Vaadeldes kahe uuritava valgu esinemist ekstratsellulaarsete vesiikulite pinnal, selgus, et MAGE-A4 valku leidis kõige rohkem eksosoomide pinnal ja eksosoomidega peaaegu võrdselt apoptootiliste kehakeste pinnal. Mikrovesiikulite pinnal oli valku tunduvalt vähem. Tulemused vastasid MAGE-A4 ekspressiooniprofiilile ekstratsellulaarsetes vesiikulites. MAGE-A10 valku leidis vähesel määral ekstratsellulaarsete vesiikulite pinnal, aga palju vähem kui MAGE-A4 valku. Erinevate rakuliinidega korraldatud katseid võrreldes ei olnud märgata, et MAGE-A10 ekspressioon oleks alati suurem olnud ühes kindlas vesiikulitüübis.

MAGE-A4 valgu puhul uuriti ka tema esinemist erinevates rakuorganites. Selgus, et MAGE-A4 näol on tegemist tsütoplasma valguga, mida teistes uuritavates rakuorganites ei ekspresseerunud.

## Tänuavaldused

Täna kõige enam oma juhendajat, *Ph. D.* Reet Kurge, kes pakkus mulle võimaluse osaleda melanoomi antigeenide uuringu projektis, rakendada oma oskusi ning saada uusi teadmisi ja huvitavaid kogemusi. Olen väga tänulik tema meisterliku juhendamise eest.

Soovin tänada ka kõiki inimesi Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudi laboris 431, kes löid oma kohaloluga meeldiva õhkkonna ja aitasid mind vajadusel. Eriliselt tõstan esile Eve Toomsood, Kadri Õunapit ja Anneli Kuldkeppi.

## Kasutatud kirjandus

- Almeida, L. G., Sakabe, N. J., deOliveira, A. R., ... Vasconcelos, A. T. R. (2009). **CTdatabase: a knowledge-base of high-throughput and curated data on cancer-testis antigens**. *Nucleic Acids Res.* 37: D816–D819.
- Alves, P. M. S., Lévy, N., Bouzourene, H., ... Lévy, F. (2007). **Molecular and immunological evaluation of the expression of cancer/testis gene products in human colorectal cancer**. *Cancer Immunology, Immunotherapy.* 56 (6): 839–847.
- Andreola, G., Rivoltini, L., Castelli, C., ... Fais, S. (2002). **Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles**. *J Exp Med.* 195: 1303–1316.
- Bai, S., He, B., Wilson, E. M. (2005). **Melanoma antigen gene protein MAGE-11 regulates androgen receptor function by modulating the interdomain interaction**. *Mol. Cell. Biol.* 25: 1238–1257.
- Bai, S., Wilson, E. M. (2008). **Epidermal-growth-factor-dependent phosphorylation and ubiquitinylation of MAGE-11 regulates its interaction with the androgen receptor**. *Mol. Cell. Biol.* 28: 1947–1963.
- Bertrand, M. J. M., Huijbers, I., Chomez, P., De Backer, O. (2004). **Comparative expression analysis of the MAGE genes during embryogenesis and brain development**. *Developmental Dynamics* 230 (2): 325–334.
- Borges, F. T., Reis, L. A., Schor, N. (2013). **Extracellular vesicles: structure, function, and potential clinical uses in renal diseases**. *Braz J Med Biol Res.* 46 (10): 824–830.
- Chomez, P., De Backer, O., Bertrand, M., De Plaen, E., Boon, T., Lucas, S. (2001). **An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family**. *Cancer Res.* 61: 5544–5551.
- Clayton, A., Mitchell, J. P., Court, J., Mason, M. D., Tabi, Z. (2007). **Human tumor-derived exosomes selectively impair lymphocyte responses to interleukin-2**. *Cancer Res.* 67: 7458–7466.
- Dabovic, B., Zanaria, E., Bardoni, B., Lisa, A., Bordignon, C., Russo, V., Matessi, C., Traversari, C., Camerino, G. (1995). **A family of rapidly evolving genes from the sex**

**reversal critical region in Xp21, Mamm. Genome 6: 571–580.**

De Plaen, E., Arden, K., Traversari, C., ... Brasseur, R. (1994). **Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family.** Immunogenetics 40: 360–369.

Doyle, J. M., Gao, J., Wang, J., Yang, M., Potts, P. R. (2010). **MAGE–RING protein complexes comprise a family of E3 ubiquitin ligases.** Mol Cell. 39: 963–74.

Emmanouilidou, E., Melachroinou, K., Roumeliotis, T., Garbis, S. D., Ntzouni, M., Margaritis, L. H., Stefanis, L., Vekrellis, K. (2010). **Cellproduced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival.** J Neurosci. 30: 6838–6851.

Espantman, K. C., O’Shea, C. C. (2010). **aMAGEing new players enter the RING to promote ubiquitylation.** Mol Cell. 39: 835–837.

Fuhrmann, G., Neuer, A. L., Herrmann, I. K. (2017). **Extracellular vesicles – a promising avenue for the detection and treatment of infectious diseases?** European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.

Jungbluth, A. A., Busam, K. J., Kolb, D., Iversen, K., Coplan, K., Chen, Y.-T., Spagnoli, G. C., Old, L. J. (2000). **Expression of MAGE-antigens in normal tissues and cancer.** Int J Cancer. 85 (4): 460–465.

Laduron, S., Deplus, R., Zhou, S., Kholmanskikh, O., Godelaine, D., De Smet, C., Hayward, S. D., Fuks, F., Boon, T., De Plaen, E. 2004. **MAGE-A1 interacts with adaptor SKIP and the deacetylase HDAC1 to repress transcription.** Nucleic Acids Res. 32 (14): 4340–4350.

Lai, R. C., Arslan, F., Lee, M. M., ... Lim, S. K. (2010). **Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury.** Stem cell research. 4: 214–222.

Lai, R. C., Chen, T. S., Lim, S. K. (2011). **Mesenchymal stem cell exosome: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease.** Regen Med. 6: 481–492.

Levy, E. (2017). **Exosomes in the Diseased Brain: First Insights from In vivo Studies.** Frontiers in Neuroscience. 11 (142): 1–9.

- Luan, X., Sansanaphongpricha, K., Myers, I., Chen, H., Yuan, H., Sun, D. (2017). **Engineering exosomes as refined biological nanoplatfroms for drug delivery.** *Acta Pharmacologica Sinica*. 1–10.
- Lucas, S., De Smet, C., Arden, K. C., Viars, C. S., Lethé, B., Lurquin, C., Boon, T. (1998). **Identification of a new MAGE gene with tumor-specific expression by representational difference analysis.** *Cancer Res*. 58: 743–752.
- Lucas, S., De Plaen, E., Boon, T. W. (2000). **MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C2, and MAGE-C3: four new members of the MAGE family with tumor-specific expression.** – *International Journal of Cancer*. 87 (1): 55–60.
- Meckes, D., Raab-Traub, N. (2011). **Microvesicles and viral infection.** *J Virol*. 85: 12844–12854.
- Meek, D.W., Marcar, L. (2012). **MAGE-A antigens as targets in tumour therapy.** *Cancer Letters*. 324: 126–132.
- Mengus, C., Schultz-Thater, E., Coulot, J., Kastelan, Z., Goluzza, E., Coric, M., Spagnoli, G. C., Hudolin, T. (2012). **MAGE-A10 cancer/testis antigen is highly expressed in high-grade non-muscle-invasive bladder carcinomas.** *International Journal of Cancer*. 132 (10): 2459–2463.
- Monte, M., Simonatto, M., Peche, L. Y., Bublik, D., B., Gobessi, S., Pierotti, M., A., Rodolfo, M., Schneider, C. (2006). **MAGE-A tumor antigens target p53 transactivation function through histone deacetylase recruitment and confer resistance to chemotherapeutic agents.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103 (30): 11160–11165.
- Morishima, N., Nakanishi, K., Takenouchi, H., Shibata, T., Yasuhiko, Y. (2002). **An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12.** *J Biol Chem*. 277 (37): 34287–34294.
- Muralidharan-Chari, V., Clancy, J., Sedgwick, A., D’Souza-Schorey, C. (2010). **Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression.** *J Cell Sci*. 123: 1603–1611.
- Peikert, T., Specks, U., Farver, C., Erzurum, S. C., Comhair, S., A., A. (2006). **Melanoma Antigen A4 Is Expressed in Non-Small Cell Lung Cancers and Promotes Apoptosis.** *Cancer Research*. 66 (9): 4693–4700.

- Porter, A. G., Jänicke, R. U. (1999). **Emerging roles of caspase-3 in apoptosis.** Cell Death Differ. 6 (2): 99–104.
- Poste, G., Nicolson, G. (1980). **Arrest and metastasis of blood-borne tumor cells are modified by fusion of plasma membrane vesicles from highly metastatic cells.** Proc Natl Acad Sci USA. 77: 399–403.
- Print, C. G., Loveland, K. L. (2000). **Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis.** Bioessays. 22: 423–430.
- Rimoldi, D., Salvi, S., Reed, D., Coulie, P., Jongeneel, V. C., De Plaen, E., Brasseur, F., Rodriguez, A.-M., Boon, T., Cerottini, J.-C. (1999). **cDNA and protein characterization of human *MAGE-10*.** Int. J. Cancer. 82: 901–907.
- Rogner, U. C., Wilke, K., Steck, E., Korn, B., Poustka, A. (1995). **The melanoma antigen gene (MAGE) family is clustered in the chromosomal band Xq28.** Genomics. 29: 725–731.
- Sakurai, T., Itoh, K., Higashitsuji, H., Nagao, T., Nonoguchi, K., Chiba, K., Chiba, T., Fujita, J. (2001). **A Cleaved Form of MAGE-A4 Binds to Miz-1 and Induces Apoptosis in Human Cells.** The Journal of Biological Chemistry. 279: 15505–15514.
- Sang, M., Lian, Y., Zhou, X., Shan, B., (2011). **MAGE-A family: Attractive targets for cancer immunotherapy.** Vaccine 29: 8496–8500.
- Scanlan, M. J., Gure, A. O., Jungbluth, A. A., Old, L. J., Chen, J. T. (2002). **Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy.** Immunological Reviews 188 (1): 22–32.
- Scanlan, M. J., Simpson, A. J., Old, L. J. (2004). **The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary.** Cancer Immun. 23: 1.
- Schultz-Thater, E., Piscuoglio, S., Iezzi, G., Magnen, C. L., Zajac, P., Carafa, V., Terracciano, L., Tornillo, L., Spagnoli, G. C. (2011). **MAGE-A10 is a nuclear protein frequently expressed in high percentages of tumor cells in lung, skin and urothelial malignancies.** International Journal of Cancer. 129(5): 1137–1148.
- Simpson, A. J., Caballero, O. L., Jungbluth, A., Chen, Y. T., Old, L. J. (2005). **Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer.** Nat Rev Cancer. 5: 615–625.



- Zendman, A. J., Ruiter, D. J., Van Muijen, G. N. (2003). **Cancer/testis-associated genes: identification, expression profile, and putative function.** J Cell Physiol. 194: 272–288.
- Théry, C., Ostrowski, M., Segura, E. (2009). **Membrane vesicles as conveyors of immune responses.** Nat Rev Immunol. 9: 581–593.
- Van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., Boon, T. (1991). **A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma.** Science 254: 1643–1647.
- Van der Pol, E., Böing, A., N., Harrison, P., Sturk, A., Nieuwland, R., Mattson, M., P. (2012). **Classification, Functions, and Clinical Relevance of Extracellular Vesicles.** Pharmacological Reviews. 64 (3): 676–705.
- Wahlgren, J. (2014). **Intercellular communication via exosomes.** Reumatoloogia- ja põletiku-uuringute osakond, meditsiiniinstituut, Göteborgi ülikooli Sahlgrenska akadeemia. Göteborg, Rootsi.
- Wiley, R. D., Gummuluru, S. (2006). **Immature dendritic cell-derived exosomes can mediate HIV-1 trans infection.** Proc Natl Acad Sci U S A. 103: 738–743.
- Wolf, P. (1967). **The nature and significance of platelet products in human plasma.** Br J Haematol. 13: 269–288.
- Yakirevich, E., Sabo, E., Lavie, O., Mazareb, S., Spagnoli, G. S., Resnick, M. B. (2003). **Expression of the MAGE-A4 and NY-ESO-1 Cancer-Testis Antigens in Serous Ovarian Neoplasms.** Clinical Cancer Research. 9 (17): 6453–6460.

## Kasutatud veebiaadressid

**Biocompare.** Anti-MAGE-A4 Antibody Products from GenWay Biotech, Inc.  
<http://www.biocompare.com/pfu/110447/soids/14174/Antibodies/MAGE-A4?vids=101334>.

Vaadatud 12.04.2017.

Kurg, R., Reinsalu, O., Jagur, S., Õunap, K., Võsa, L., Kasvandik, S., Padari, K., Gildemann, K., Ustav, M. (2006). **Biochemical and proteomic characterization of retrovirus Gag based microparticles carrying melanoma antigens.** Scientific Reports 6.  
<https://www.nature.com/articles/srep29425>. Vaadatud 19.04.2017.

Uniprot. **UniProtKB - Q99816 (TS101\_HUMAN).** <http://www.uniprot.org/uniprot/Q99816>.

Vaadatud 22.05.2017.

Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R. M., Andreu, Z., ... De Wever, O. (2015). **Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions.** J Extracell Vesicles. 4.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4433489/>. Vaadatud 21.04.2017.

# **Expression of MAGE-A4 and MAGE-A10 proteins in extracellular vesicles**

**Magda Karakai**

## **Summary**

Tumor antigens are immunogenic proteins whose expression is restricted almost only to cancer cells. They were first detected in melanoma cells and since then there are approximately 20 antigene families found. Their best known common feature is strongly restricted expression profile. Because of their immunogenity and tumor-restricted expression, they are potential targets of immunotherapy.

The present thesis studies antigens MAGE-A4 and MAGE-A10. Both antigens are strictly tumor-specific. MAGE-A family antigens probably play an important part in the evolution of cancer and spreading of metastases and because of that it is crucial to know how these antigenes spread in the human organism. It is presumed that MAGE-A4 and MAGE-A10 antigens transfer from one cell to another with extracellular vesicles. Extracellular vesicles are membrane-enveloped particles released to the extracellular matrix by most of cells and they participate in the transportation of several biomolecules between cells and tissues.

The aim of present thesis was to find out whether MAGE-A4 and MAGE-A10 proteins express in extracellular vesicles if the cells are transfected with respective plasmids. Cell lines used in the study were COP5EBNA, HEK293 and U2OS.

The results showed that the expression profiles of MAGE-A4 and MAGE-A10 plasmids in extracellular vesicles differ greatly from each other. MAGE-A4 protein expressed in all three extracellular vesicle types – exosomes, microvesicles and apoptotic bodies. It was mostly presented in exosomes, a bit less in apoptotic bodies and the least in microvesicles. MAGE-A10 protein was not present in extracellular vesicles at all, though it was expressed in cells used in the study. The reason might be a fact that MAGE-A4 is cytoplasm protein and can therefore more easily adhere to extracellular vesicles released from cell. MAGE-A10 is nuclear protein and does not have a direct contact with extracellular vesicles, therefore it is not present in extracellular vesicles.

The surface of extracellular vesicles was also studied. MAGE-A4 protein was mostly present in the surface of exosomes and almost equally in the surface of apoptotic bodies. On the

surface of microvesicles, MAGE-A4 protein expression was noticeably smaller. MAGE-A10 protein was present in the surface of extracellular vesicles, but compared to the MAGE-A4 protein, the expression rates were considerably lower.

The analysis of MAGE-A4 protein expression in different cell organs showed that MAGE-A4 is cytoplasm protein and not present in other cell organs.

# Lihtlitsents

## Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Magda Karakai,

(sünnikuupäev: 15.07.1993)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „MAGE-A4 ja MAGE-A10 valkude ekspresseerumine ekstratsellulaarsetes vesiikulites“,

mille juhendaja on *Ph. D.* Reet Kurg,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 2018. aasta juunist kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 31.05.2017.